

## 魚類骨格筋および卵母細胞への遺伝子・タンパク質 導入法の開発

著者	岩泉 雅樹
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19908号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00132157">http://hdl.handle.net/10097/00132157</a>

魚類骨格筋および卵母細胞への  
遺伝子・タンパク質導入法の開発

岩泉 雅樹

## 目次

緒言.....	1
第一章 「魚類骨格筋への EP を利用した組換えタンパク質の 血液への分泌および受精卵への導入」 .....	4
1.1 要旨 .....	5
1.2 序論 .....	6
1.3 材料と方法 .....	7
1.3.1 実験魚 .....	7
1.3.2 実験に用いたベクター .....	7
1.3.3 エレクトロポレーション (EP) .....	8
1.3.4 X-gal 染色 .....	8
1.3.5 免疫染色 .....	8
1.3.6 写真撮影 .....	9
1.3.7 PCR .....	9
1.3.8 ルシフェラーゼアッセイ .....	10
1.3.9 SDS-PAGE ゲル中でのルシフェラーゼアッセイ .....	10
1.3.10 Blue-Native PAGE ゲル中でのルシフェラーゼアッセイ .....	11
1.4 結果 .....	11

1.4.1	ゼブラフィッシュ骨格筋へのレポーター遺伝子の導入.....	11
1.4.2	組換えタンパク質の血液への分泌効果および受精卵の取り込み.....	12
1.4.3	ヒラメへの応用 .....	14
1.4.4	水泡眼への応用 .....	14
1.5	考察 .....	15
第二章	「卵巣への注射 (IMO: injection into the mother's ovary)による タンパク質の導入.....	20
2.1	要旨 .....	21
2.2	序論 .....	22
2.3	材料と方法 .....	23
2.3.1	実験魚 .....	23
2.3.2	GFP-Luc と Cas9-Luc の合成.....	23
2.3.3	RNP .....	24
2.3.4	Cas9-GFP-Luc の合成.....	24
2.3.5	IMO (Injection into mother's ovary) .....	25
2.3.6	写真撮影 .....	25
2.3.7	ルシフェラーゼアッセイ .....	25

2.3.8	HMA .....	25
2.3.9	IMO を用いた種々の物質の受精卵への導入.....	26
2.3.10	受精卵のクロロキン浸漬実験 .....	26
2.4	結果 .....	27
2.4.1	GFP-Luc の精製.....	27
2.4.2	IMO による GFP-Luc の導入 .....	27
2.4.3	Cas9-Luc の精製.....	27
2.4.4	IMO による Cas9-Luc の導入.....	28
2.4.5	IMO による RNP の導入.....	28
2.4.6	Cas9-GFP-Luc の合成.....	29
2.4.7	IMO を用いた種々の物質の受精卵への導入.....	29
2.4.8	受精卵のクロロキン浸漬実験 .....	29
2.5	考察 .....	30
	総合考察 .....	35
	謝辞 .....	37
第一章	図 .....	38
第一章	表 .....	48

第二章 图 .....	50
第二章 表 .....	57
引用文献 .....	64

第一章は、下記の学術論文として発表した内容を含んでいる。

Iwaizumi, M., Yokoi, H., Suzuki, T., 2020. Plasmid delivery by electroporation into fish skeletal muscle for recombinant protein secretion and uptake by oocytes. *Fish Physiol Biochem* 46, 1121-1130.

第一章は、下記の投稿中の学術論文の内容を含んでいる。

Iwaizumi, M., Yokoi, H., Suzuki, T. Delivery of exogenous proteins into eggs by injection into the mother's ovary (IMO) in zebrafish. *Fish Physiol Biochem* 投稿中.

## 緒言

最近開発された CRISPR/Cas9 法や TALEN 法などのゲノム編集技術により、非モデル生物においてもゲノム情報を簡便に改変することが可能になり、農畜水産分野にも利用され始めている (Goto et al., 2019; Gratacap et al., 2019)。水産増養殖分野においては、通常よりも可食部の筋肉量が多いマダイやヒラメなどが作出されている (Kim et al., 2019; Kishimoto et al., 2018)。また、マグロにおいては、衝突死を防ぐために遊泳速度の遅い系統が作出されており (Higuchi et al., 2019)、ゲノム編集を利用した新品种の開発が始まっている。

CRISPR/Cas9 法では、guide RNA がゲノム上の標的配列に結合し、その部分を Cas9ヌクレアーゼが切断する。TALEN 法では、DNA 結合ドメインで標的配列に結合し、FokIヌクレアーゼが DNA を切断する。切断された部位が非相同組み換えによって修復される際に多発する塩基の挿入や欠損により、タンパク質の読み枠がずれることを利用して遺伝子ノックアウト (KO)を行う (Christian et al., 2010; Jinek et al., 2012)。

魚類でのゲノム編集は、gRNA と Cas9 を顕微注入で受精卵に導入する方法が一般的である。しかし、顕微注入には、熟練した技術が必要であることや、卵内に海水由来のイオンが流入して生残率が低いこと、一細胞期という限られた時間の中で大量の受精卵を処理しなければならないなどの問題点がある。また、卵膜が硬く顕微注入が困難な魚種やそもそも受精卵を得ることが困難な魚種も少なくない。さらに、養殖魚の場合は、世代時間が長いため、種苗として出荷可能なホモの変異体を得るのに 10 年程度の長い年月を要する事も障壁となっている。

これらの諸問題を克服するために、本研究では、雌親魚の卵巣内卵母細胞に gRNA と Cas9 を導入してゲノム編集を行うことを着想した。卵母細胞にゲノム編集コンポ



ーメントを導入できれば、煩雑な顕微注入を回避することができ、また受精卵内で卵由来と精子由来のゲノム両方を改変することにより F0 でホモの変異体を得て、養殖魚におけるゲノム編集を大幅に効率化することに貢献できるのではないかと考えている。卵母細胞でゲノム編集を行う戦略としては、既に蚊において、卵黄タンパク質の取り込み機構を利用したゲノム編集が行なわれている (Chaverra-Rodriguez et al., 2018)。アフリカツメガエルにおいては、ビテロジェニン受容体結合配列を付加したストレプトアビジンとビオチン標識した DNA を結合させて卵母細胞に導入したという報告がある (Rungger et al., 2017)。また、マウスにおいては受精卵を体外でエレクトロポレーション (EP : electroporation) し、ゲノム編集する方法や卵管内の受精卵に EP してゲノム編集する方法が開発されている (Hashimoto et al., 2016; Ohtsuka et al., 2018; Takahashi et al., 2015)。i-GONAD 法 (improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) では、簡便にゲノム編集を行うことができ、習熟した技術が必要な受精卵への顕微注入に代わって、ゲノム編集の標準的な導入法として世界中で採用されつつある。魚類では、水泡眼のビテロジェニンをゼブラフィッシュの卵母細胞に導入した報告や、メダカにおいてビテロジェニンと GFP の融合タンパク質を肝臓から分泌させて受精卵に導入したという報告がある (Matsuda et al., 2011; Murakami et al., 2019)。しかし、顕微注入を用いないゲノム編集方法はまだ開発されておらず、技術開発により様々な魚種への応用が期待される。

本研究は、受精卵への顕微注入を用いないゲノム編集技術の開発に向けて、第一章に記述した「魚類骨格筋への EP を利用した組換えタンパク質の血液への分泌および受精卵への導入」と第二章に記述した「卵巣への注射 (IMO : injection into the mother's ovary) によるタンパク質の導入」の 2 つの方法により実験を行った。第一章では、ゼブラフィッシュの骨格筋に分泌型ルシフェラーゼを発現するベクターを EP で導入したところ、受精卵においてルシフェラーゼ活性が検出できた。このことか

ら、筋細胞から血液中にタンパク質を分泌させて受精卵に導入することは可能であることがわかった。また、ゼブラフィッシュの卵巣に *CMV:GFP* を EP で導入する実験を行った。GFP 蛍光は、濾胞細胞で確認できたが、卵母細胞自体では蛍光が確認できなかった。第二章では、GFP とルシフェラーゼの融合タンパク質 (GFP-Luc) をゼブラフィッシュの卵巣に注射した後、受精卵を得る実験を行った。注入したタンパク質に由来する GFP 蛍光は受精卵の卵黄において検出できた。このことから、ゼブラフィッシュの卵母細胞は非特異的にタンパク質を取り込む性質があることがわかった。次に、蛍光標識した gRNA と Cas9 タンパクの複合体 (RNP) を卵巣に注射し、受精卵を得たところ、卵黄で蛍光を検出できた。しかし、ゲノム編集による変異導入は確認できなかった。卵黄中のタンパク質は、卵黄顆粒内 (エンドソーム) に封入されている可能性が考えられる。Chaverra-Rodriguez et al (2018) の蚊の報告では、エンドソームを破壊するためにクロロキンを用いてゲノム編集を行っていた (Chaverra-Rodriguez et al., 2018)。本研究では、ゼブラフィッシュ受精卵のクロロキン溶液に対する耐性も調べた。

今後は、クロロキンなどのエンドソーム破壊剤などを用いるなど、RNP を卵黄顆粒から解放する方法を検討する必要がある。

本研究では、第一章、第二章を通して、顕微注入せずに卵母細胞経由で受精卵に組換えタンパク質を導入することに成功した。この成果は、受精卵への顕微注入を用いないゲノム編集の実現に近づいたと言える。

## 第一章

魚類骨格筋への EP を利用した組換えタンパク質の  
血液への分泌および受精卵への導入

## 1.1 要旨

顕微注入を用いないゲノム編集を実現するために、本研究では、EP（エレクトロポレーション）を利用して骨格筋に遺伝子導入を行い、目的物質の発現・分泌後に血流を介して卵に輸送する方法を考案した。まず、ゼブラフィッシュの骨格筋に *CMV:GFP* を EP で導入したところ、骨格筋の広範囲に強い GFP 蛍光が確認でき、180 日以上発現が持続した。また、*CMV:tdTomato* や *CMV:lacZ* についても、EP で骨格筋に導入して発現させることに成功した。これらのことから、EP を用いれば骨格筋の広範囲に長期間に渡って外来性の遺伝子を発現させることが可能であることがわかった。次に血液へのタンパク質の分泌効果を調べるため、*CMV:secLuc*（分泌型ルシフェラーゼを発現するベクター）、*CMV:GH-Luc*（トラフグの成長ホルモンとルシフェラーゼの融合タンパク質を発現するベクター）を用意した。EP で *CMV:secLuc* と *CMV:GH-Luc* をゼブラフィッシュの骨格筋に導入したところ、いずれのベクターを導入した個体においても、血液からルシフェラーゼ活性が検出できた。次に、他魚種においても血液中あるいはリンパ液中へのタンパク質の分泌が可能であるか試験した。ヒラメや水泡眼の骨格筋に *CMV:secLuc* と *CMV:GH-Luc* を EP で導入したところ、ヒラメの血液や水泡眼のリンパ液中でルシフェラーゼ活性が検出できた。さらに、ゼブラフィッシュにおいて、*CMV:secLuc* を導入した雌個体から得た受精卵から、ルシフェラーゼ活性が検出できた。これらの結果は、筋細胞で合成されたルシフェラーゼが血液中に分泌され、受精卵に取り込まれたことを示しており、顕微注入を用いないゲノム編集を実現する上で重要な技術に展開できるものと期待された。

## 1.2 序論

EP は、細胞膜に電圧をかけて穴をあけ、遺伝子導入する方法である。マウスにおいて骨格筋への EP は、DNA ワクチンの導入などに利用されている (Sokolowska and Blachnio-Zabielska, 2019)。

本章では、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) やヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、水泡眼 (*Carassius auratus*) を用いて、実験を行った。ゼブラフィッシュは、魚類のモデル生物として幅広く利用されている。これまでに、ゼブラフィッシュに EP を行い、DNA ワクチンの研究やがん細胞のモデルフィッシュの作出などを行った実験が報告されている (Callahan et al., 2018; Myllymaki et al., 2018)。ヒラメは、養殖対象魚種として有名である。養殖対象魚種では、チャイロマルハタ (*Epinephelus coioides*) において Luteinizing hormone (LH) を EP で骨格筋に導入して、卵巣を早期成熟させたという報告やヨーロッパアンシーバス (*Dicentrarchus labrax*) において siRNA を用いてミオスタチンの発現を抑制したという報告がある (Lv et al., 2018; Terova et al., 2013)。水泡眼は、顔の左右にリンパ液で満たされた水泡を持つキンギョである。リンパ液は、採取しても 1 週間程度で元の量に戻るなので繰り返し採取可能である。水泡眼のリンパ液は、これまでに細胞培養の培地に利用されたり、卵黄タンパク質のビテロジェニンの合成に利用されたりしている (Matsuda et al., 2011; Sawatari et al., 2009)。

本研究では、受精卵への顕微注入を用いないゲノム編集方法の実現および養殖魚への活発な EP による優良個体作出を目指して実験を行った。ゼブラフィッシュについては、EP による骨格筋への遺伝子導入効果および組換えタンパク質の血液への分泌、血液へ分泌された組換えタンパク質の受精卵への導入についての実験を実施した。ヒラメについては、EP による骨格筋への遺伝子導入効果と組換えタンパク質の血液への分泌についての実験を実施した。水泡眼については、EP による骨格筋への遺伝子導入効果とリンパ液への組換えタンパク質についての実験を実施した。

## 1.3 材料と方法

### 1.3.1 実験魚

実験魚には、ゼブラフィッシュ、ヒラメ稚魚および水泡眼を用いた。ゼブラフィッシュと水泡眼は、宮城県仙台市のペットショップで購入した。ヒラメ稚魚は、愛知県田原市のマリンテック株式会社から購入した。ゼブラフィッシュの飼育は、The Zebrafish Book を参考にして 14 時間明期・10 時間暗記の照明条件で飼育した (Westerfield, 2007)。実験魚に EP を行う時や、血液やリンパ液の採取する時、および解剖する時は、麻酔をかけた。ゼブラフィッシュと水泡眼の麻酔には、MS222 を用いた。ヒラメ稚魚の麻酔には、0.1% フェノキシエタノールを用いた。すべての実験は、「東北大学における動物実験等に関する規程」に従って実験した。

### 1.3.2 実験に用いたベクター

組織への遺伝子導入を確認するためのベクターは、*pCS2-GFP (CMV:GFP)* を用いた。X-gal 染色のためのベクターは、*pcDNA3.1/V5-His-TOPO-lac Z (CMV:Lac Z, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)* を使用した。ルシフェラーゼアッセイのためのベクターは、*pNL1.3CMV [secNluc/CMV] plasmid (CMV:secLuc, secretory nanoluciferase-coding plasmid, Promega, WI, USA)* を使用した。また、トラフグの成長ホルモン (GH: growth hormone) のコード領域 (GenBank accession number: XM\_029836218) を PCR で増幅し、*pcDNA3.1/V5-His TOPO TA vector (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)* にクローニングした。*CMV:tdTomato*、*CMV:GH-Luc*、*CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg*、*CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* は、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs, MA, USA) を用いて作成した。アセンブリーに用いたプライマーの塩基配列は表 1 に示した。

*CMV:GH-Luc* は、骨格筋で組換えタンパク質を分泌させて、ルシフェラーゼ活性を

用いて検出可能か調べるために作成した。*CMV:GH-Luc* の HiBiT tag と Factor Xa、His tag は、以下に示す応用のために付加した。His tag は、タンパク質の精製に利用でき、Factor Xa は、GH-Luc からルシフェラーゼを除去するために利用できる。HiBiT tag は、ルシフェラーゼ除去後の GH を検出するために利用できる。*CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg* および *CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* は、GFP や tdTomato を骨格筋から分泌させて、卵母細胞に導入できるか調べるために作成した。

### 1.3.3 エレクトロポレーション (EP)

魚の骨格筋にプラスミド溶液を注射器 (Hamilton 705RN, NV, USA) で注射した後に、EP を行った。エレクトロポレーターは、スーパーエレクトロポレーター NEPA21 (Nepa Gene, Chiba, Japan) を使用した。電極は、CUY65OP10 electrode (Nepa Gene) を使用した。プラスミド溶液を注射器内で可視化するためにフェノールレッドを使用した。EP の条件 (Exp-1-13) は、表 2 に示した。ゼブラフィッシュとヒラメの EP は、50 倍希釈した人工海水の中で行った。水泡眼の EP は、淡水中で行った。

魚の卵巣へのプラスミドの導入効果を調べるため、卵巣に *CMV:GFP* 5 µg を注射して EP を行う実験も実施した。

### 1.3.4 X-gal 染色

*CMV:GFP* と *CMV:lacZ* をゼブラフィッシュの骨格筋に EP で導入し、7 日後に GFP 蛍光を確認した。GFP 発現部位を切断し、筋肉断片を作成した。作成した筋肉断片を 1 mM X-gal に浸漬し、37°C でインキュベートして染色した。筋肉断片の切断面における GFP 発現部位と lacZ 発現部位を観察した。

### 1.3.5 免疫染色

EP で *CMV:GFP* を骨格筋に導入した個体 (7 dpi : days post-injection) の GFP 発現

部位を切断して、ブアン固定し、パラフィン切片を作製した。また、EP で *CMV:GFP* を卵巣に導入した個体 (7 dpi) の卵巣を取り出し、4% paraformaldehyde (PFA) で固定し、パラフィン切片を作製した。パラフィン切片は、脱パラ後にブロッキング処理を行った。その後、1 次抗体の anti-GFP antibody (GeneTex, CA, USA) を 1000 倍希釈した液を加え、1 時間インキュベートし、PBST で洗浄した。骨格筋切片については、二次抗体の Simple Stain-AP Multi (Nichirei, Tokyo, Japan) をインキュベートして、PBST で洗浄し、NBT/BCIP solution (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) で発色させた。その後、4% PFA で反応を止め、PBST で洗浄した。卵巣切片については、二次抗体の Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit SFX antibody (Molecular Probes, OR, USA) を 1000 倍希釈した液でインキュベートし、PBST で洗浄した。

### 1.3.6 写真撮影

写真は、デジタルカメラ (Leica DFC500, Wetzlar, Germany) を実体顕微鏡 (Leica MZ16F) に接続し、撮影した。画像処理は、Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems, CA, USA) で行った。

### 1.3.7 PCR

*CMV:GFP* を骨格筋に EP で導入してから 1 日後、4 日後、106 日後、および 182 日後の個体について GFP 発現部位を切断し、DNA をフェノール・クロロホルム抽出法で抽出して PCR を行った。PCR は、Takara Taq (タカラバイオ、滋賀県草津市) を使用し、付属マニュアルに従って実施した。PCR の条件は、熱変性を 95°C で、アニーリングは、60°C、伸長反応は 72°C で行い、41 サイクルで実施した。以下に GFP のプライマーと DNA 抽出のポジティブコントロールとなる  $\beta$ -actin のプライマーの配列を示す。



GFP F: TCTGCACCAACCGGCAAGCTG

GFP R: TGGTTGTCGGGCAGCAGCAC

$\beta$ -actin F: TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA

$\beta$ -actin R: GATCCAGACAGAGTATTTACGC

### 1.3.8 ルシフェラーゼアッセイ

ゼブラフィッシュの採血は、Babaei *et al.* (2013) の論文に記載されている方法で行った (Babaei *et al.*, 2013)。抗凝血剤は、0.5 M EDTA を用いた。ゼブラフィッシュの血液は、それぞれの個体から 10  $\mu$ L 程度回収できた。ヒラメの血液は、シリンジ内を 10  $\mu$ L の 0.5 M EDTA で湿らせた 1 mL のプラスチックシリンジを用いて、尾静脈から採血した。ヒラメの血液は、各個体から 100  $\mu$ L 程度回収できた。水泡眼のリンパ液は、1 mL のプラスチックシリンジで回収した。ルシフェラーゼアッセイには、Nano-Glo luciferase assay system (Promega)を使用した。

ゼブラフィッシュについては、血液から血球成分を除去せず 100  $\mu$ L の Nano-Glo luciferase assay reagent と混ぜてルシフェラーゼアッセイを行った。ゼブラフィッシュの受精卵については、受精卵を 100  $\mu$ L の PBST 中でホモジナイズした液を Nano-Glo luciferase assay reagent と混ぜた。ヒラメについては、血液を DW で 10 倍希釈した液を 100  $\mu$ L の Nano-Glo luciferase assay reagent と混ぜた。水泡眼については、リンパ液 100  $\mu$ L を 100  $\mu$ L の Nano-Glo luciferase assay reagent と混ぜた。発光値の測定には、GloMax-Multi+ Detection System (Promega)を使用した。

### 1.3.9 SDS-PAGE ゲル中でのルシフェラーゼアッセイ

骨格筋に *CMV:GFP* と *CMV:secLuc* を共導入したゼブラフィッシュおよび *CMV:GFP* と *CMV:GH-Luc* を共導入ゼブラフィッシュについて、EP から 7 日後に GFP 発現部位を切断し、PBST 中でホモジナイズした。また、成熟した雌のゼブラフ

イッシュの骨格筋に *CMV:GFP* と *CMV:secLuc* を EP で導入し、7 日後に卵巣を取り出し PBST 中でホモジナイズした。ホモジナイズした液の一部を、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後に、Nano-Glo In-Gel Detection System (Promega)のプロトコルに従ってゲル中でルシフェラーゼアッセイを行った。基質発光の写真撮影は、ChemiDoc XRS instrument (BioRad, CA, USA)で行った。

#### 1.3.10 Blue-Native PAGE ゲル中でのルシフェラーゼアッセイ

骨格筋に *CMV:GFP* と *CMV:secLuc* を導入した水泡眼および *CMV:GFP* と *CMV:GH-Luc* を EP で導入してから 7 日後の水泡眼のリンパ液を回収して、Blue-Native PAGE を行った。Blue-Native PAGE は、岡田氏らの本に記載の方法で行った (岡田ら, 2013)。電気泳動には、13% ポリアクリルアミドゲルを使用した。泳動後のゲル中のルシフェラーゼアッセイには、Nano-Glo In-Gel Detection System を使用し、写真撮影には ChemiDoc XRS instrument (BioRad)を用いた。

### 1.4 結果

#### 1.4.1 ゼブラフィッシュ骨格筋へのレポーター遺伝子の導入

ゼブラフィッシュの骨格筋に *CMV:GFP* に注射し、EP を行った個体と EP を行わなかった個体について、経時的に GFP 蛍光を観察した (Exp-1)。EP なしの個体は、注射した位置の周辺の狭い領域において GFP 蛍光が検出できた。EP ありの場合は、注射と EP を行った周辺の広範囲において GFP 蛍光が検出できた (Fig. 1A,B)。GFP 蛍光は、EP を行った個体および EP を行わなかった個体のいずれにおいても、EP の 182 日後においても検出できた。また、EP から 20 ヶ月以上も GFP 蛍光が持続した個体もいた (Fig. 1C)。骨格筋の GFP 発現部位の切片を、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色したところ、骨格筋細胞質において GFP の局在が確認できた (Fig. 1D)。骨格筋の

GFP 発現部位から DNA を抽出し、PCR を行ったところ、EP から 187 日後の個体においても GFP のバンドを検出できた (Fig. 1E)。このことから、*CMV:GFP* は半年以上に渡って骨格筋内に存在することが示された。

さらに、赤色蛍光タンパク質である tdTomato をコードしている *CMV:tdTomato* も EP でゼブラフィッシュの骨格筋に導入したところ (Exp-2)、強い赤色蛍光を検出できた (Fig. 1F)。*CMV:GFP* と *CMV:lacZ* を EP で骨格筋に導入したゼブラフィッシュ (Exp-3) の GFP 発現部位を切り出し、X-gal 染色したところ、GFP と LacZ の発現部位が一致していることがわかった (Fig. 1G)。このように EP により各種の発現ベクターを骨格筋に導入して、組換えタンパク質を発現できることが示された。

#### 1.4.2 組換えタンパク質の血液への分泌効果および受精卵の取り込み

次に、ゼブラフィッシュの骨格筋にプラスミドを導入して血液中に組換えタンパク質を分泌させることが可能かどうか試験した。この実験には、*CMV:secLuc* と *CMV:GH-Luc* を使用した。*CMV:secLuc* は、分泌型ルシフェラーゼをコードしている。*CMV:GH-Luc* は、トラフグの成長ホルモンとルシフェラーゼの融合タンパク質をコードしている (Fig. 2A)。EP で骨格筋に *CMV:secLuc* を導入した個体 (Exp-4) および *CMV:GH-Luc* を導入した個体 (Exp-5) の骨格筋ホモジネートで SDS-PAGE を行った。導入した遺伝子の発現を確認するために、ゲル中でルシフェラーゼアッセイを行ったところ、いずれの個体においても組換えタンパク質のバンドを検出することができた。Control は、プラスミドを注射していない個体であり、バンドは、検出されていない (Fig. 2B)。これらの結果から、骨格筋において組換えタンパク質が合成されていることが確認された。また、骨格筋に *CMV:secLuc* を導入した個体と *CMV:GH-Luc* を導入した個体から、採血してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、血液からルシフェラーゼ活性が検出できた (Fig. 2C)。Control は、プラスミドを導入していない個

体を使用した。

成熟した雌の骨格筋に EP で *CMV:secLuc* を導入してから 7 日後の個体の卵巣のホモジネートに SDS-PAGE を行った。ゲル中でルシフェラーゼアッセイを行うとバンドが検出できた (Fig. 2D)。さらに、*CMV:secLuc* を導入してから 7 日後の個体を自然交配させると、受精卵からルシフェラーゼ活性が検出できた。このことから、血液中に分泌された組換えタンパク質は卵母細胞に取り込まれたことがわかった (Fig. 2E)。

次にルシフェラーゼと同様に、GFP や tdTomato などの蛍光タンパク質も骨格筋から血液へ分泌させ、卵母細胞に導入できるか調べるために *CMV : SP-HB-EGFP-NLS-Vg* (Fig. 3A) と *CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* (Fig. 4A) を作成した。これらのベクターでは、骨格筋からの分泌を促進するために分泌シグナルを、また卵母細胞への取り込みおよび核への移行を促進するために、ゼブラフィッシュのビテロジェニン受容体結合配列の 8 アミノ酸 IVTKSKDL (Li et al., 2003) と核移行シグナル(NLS)を付加している。*CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg* を EP で雌のゼブラフィッシュに導入し (Exp-6)、7 日後に骨格筋を観察したところ、GFP 蛍光を検出できた。しかしながら、この個体を解剖して卵巣を観察したところ、卵母細胞において GFP 蛍光は検出されなかった (Fig. 3B,C)。 *CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* (Exp-7)についても、同様に骨格筋での赤色蛍光は検出できたが、卵母細胞では検出できなかった (Fig. 4B,C)。蛍光タンパク質は、ルシフェラーゼよりも検出感度が低いため、卵母細胞から蛍光を検出できなかった可能性が考えられる。

次に EP で卵巣内卵母細胞に *CMV:GFP* を導入し、発現させることが可能か試験した。卵巣に *CMV:GFP* を注射して EP を行った (Fig. 5A)。EP から 7 日後に解剖したところ、濾胞細胞で GFP 蛍光が検出できたが卵母細胞からは検出できなかった (Fig. 5B)。また、卵巣切片を作製して抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったがシグナルは、濾胞細胞で検出できたが卵母細胞からは検出できなかった (Fig. 5C)。

### 1.4.3 ヒラメへの応用

次にヒラメ稚魚に EP を行った (Fig. 6A)。CMV:GFP を EP で導入したところ、EP の 7 日後から 140 日後にかけて GFP 蛍光が検出された (Exp-8)。EP の 56 日後から 140 日後にかけては、GFP 蛍光は減少していった (Fig. 6B)。これは、ヒラメ稚魚の成長に伴って、骨格筋が分裂し、細胞内の CMV:GFP が減少していったことが原因と考えられる。もしくは、魚種によって EP で導入した遺伝子の発現期間に差がある可能性もある。さらに、骨格筋に CMV:secLuc を EP で導入し (Exp-9)、採血してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ルシフェラーゼ活性を検出できた (Fig. 6C)。同様に、骨格筋に EP で CMV:GH-Luc を導入したところ (Exp-10)、血液サンプルにおいてルシフェラーゼ活性が検出された (Fig. 6D)。ヒラメにおいてもゼブラフィッシュと同様に、EP により骨格筋に遺伝子導入し、血液中に組換えタンパク質を分泌させてルシフェラーゼアッセイで検出可能であることがわかった。

### 1.4.4 水泡眼への応用

次に水泡眼への EP を行った (Fig. 7A)。Control の個体 (Exp-11) と CMV:secLuc を導入した個体 (Exp-12)、CMV:GH-Luc を導入した個体 (Exp-13) を用いて、経時的にリンパ液を採取してルシフェラーゼアッセイを行った。骨格筋における GFP 蛍光は、ゼブラフィッシュやヒラメと異なり、EP を行ってから、7 日後から 28 日後にかけて減少した (Fig. 7B)。これは、魚種によって EP で導入した遺伝子の発現期間が異なる可能性が考えられる。EP から、7 日後のリンパ液中のルシフェラーゼ活性は、ゼブラフィッシュやヒラメと同程度であったが、EP から 7 日後から 28 日後の間に減少した (Fig. 7C, D)。骨格筋における GFP 蛍光も減衰しているので、細胞内のベクターが分解されていったと考えられる。また、secLuc が分泌されているリンパ液と GH-Luc が分泌されているリンパ液を用いて Blue native page を行い、ゲル中でルシフェラーゼアッセイを行ったところ、secLuc のバンドは、検出できたが、GH-Luc のバンドは検

出されなかった (Fig. 7E)。GH-Luc は、GH が付加されたことによって、ルシフェラーゼ活性や分泌量が減少したと推定される。

## 1.5 考察

第一章では、受精卵への顕微注入を用いないゲノム編集の実現および養殖魚への活発な EP による優良個体作出を目指して実験を行った。ゼブラフィッシュ骨格筋では、EP を利用して種々のレポーター遺伝子を発現可能であることが示された。ゼブラフィッシュ骨格筋では、EP から 187 日目まで強い GFP 蛍光が検出された。20 ヶ月以上に渡って強い GFP 蛍光が持続した個体もいた。ヒラメでは、EP から 56 日から 140 日の間で、水泡眼では EP から 7 日後から 28 日後の間で GFP 蛍光が減衰した。ニワトリ胚において、tol2 システムを用いた場合は、EP で導入したベクターがゲノムに挿入され、発現が長期間持続し、tol2 システムを用いない場合は、発現が短期間で消失したという報告がある (Sato *et al.*, 2007)。ゼブラフィッシュについては、tol2 システムを用いなくても、EP で導入したベクターの発現が長期間持続することが示された。ゼブラフィッシュ骨格筋内での長期間の遺伝子発現は、2 つの理由が考えられる。一つ目は、導入したベクターが骨格筋ゲノムに挿入され、発現が長期間持続したという理由である。2 つ目は、実験に使用したゼブラフィッシュは、成魚であり、骨格筋が分裂せず、導入したベクターが細胞内に長期間分解されずに残存したという理由である。今後 EP で骨格筋に遺伝子導入を行った個体から DNA を抽出し、サザンブロッティングで導入したベクターのゲノムへの挿入の有無を判定する必要がある。ヒラメや水泡眼において GFP 蛍光が減衰したのは、魚種によって EP で導入したベクターの発現持続期間が異なる可能性がある。ヒラメに関しては、今回実験に用いた個体が稚魚であり、成長に伴って骨格筋が分裂し、細胞内におけるベクター濃度が低下した可能性も考えられる。今後、複数の魚種において十分な個体数を用意して、EP で導入したベクターの発現期間を確認する実験が考えられる。

次に、ゼブラフィッシュとヒラメの血液を用いたルシフェラーゼアッセイの結果から魚類の骨格筋から血液中に組換えタンパク質を分泌させることが可能であるということがわかった。チャイロマルハタにおいて、EP で骨格筋に LH をコードしているベクターを導入して、血液中の E2 の濃度を測定した実験がある (Lv et al., 2018)。本研究では、レポーターとしてルシフェラーゼを使用したため血液中に分泌された組換えタンパク質をルシフェラーゼアッセイで簡単に検出することができた。血液サンプルのルシフェラーゼ活性から、血液中の組換えタンパク質の濃度を測定する実験などへの応用が期待される。将来的にペプチドホルモンを分泌させて高成長する個体の作出などに応用可能である。ゼブラフィッシュとヒラメの血液中のルシフェラーゼ活性には、個体によってバラつきが見られた。これは、EP による骨格筋への遺伝子導入の効率の差が原因と考えられる。注射針を刺す深さや EP を行う場所や電圧条件の検討によって、個体間のバラつきを少なくできると考えられる。

ゼブラフィッシュの骨格筋において強く発現するプロモーターとして、*tbp* (TATA box binding protein gene) や *tbn1* (TATA box binding protein associated factor gene)、*eef1g* (eukaryotic elongation factor 1-gamma gene)、*bactin1* (beta-actin-1 gene) などが報告されている (Burket et al., 2008)。第一章で用いたプロモーターは CMV のみだが、今後は複数のプロモーターの中から、実験目的に最適なプロモーターを決定するような実験も検討していく必要がある。メダカにおいて 3 種類の Cre/loxP を導入したという報告がある (Kishimoto et al., 2016)。EP と Cre/loxP システムを組み合わせれば、導入した遺伝子を時期特異的あるいは組織特異的に発現させることが可能となるので、さまざまな実験に応用可能となる。例えば、組織特異的なプロモーターを持つベクターを EP で導入し、特定の細胞を GFP で標識する実験などに応用可能である。

ゼブラフィッシュにおいて、骨格筋で発現した組換えタンパク質が、血液中に分泌され、受精卵に取り込まれていることが示された。魚類の卵母細胞は、成熟する際に特異的な受容体を介したピノサイトーシスにより大量のビテロジェニンを取り込む性質が知られている

(Clelland and Peng, 2009)。血液中に分泌されたルシフェラーゼは、ピノサイトーシス小胞内に非特異的に取り込まれ、卵母細胞内に蓄積したと考えられる。この結果は、ゲノム編集の gRNA と Cas9 の複合体 (RNP) を骨格筋から分泌させて卵母細胞および受精卵に導入する方法を開発することに役立つと考えられる。しかし、ルシフェラーゼとは異なり、GFP や tdTomato を骨格筋から分泌させて、卵母細胞で検出することはできなかった。ルシフェラーゼは、蛍光タンパク質よりも非常に高感度なので卵巣や受精卵から検出できたと推定される。ルシフェラーゼは高感度である一方で、in vivo で測定するには高価な装置が必要となる。そのため、組織内の局在を把握しやすい蛍光タンパク質を、骨格筋から血液へ分泌させ、卵母細胞経由で受精卵に導入する手法を開発することは重要である。それを実現するには、分泌能力の高い分泌シグナルを選別することも解決法の 1 つと考えられる。メダカにおいて、肝臓からビテロジェニンの分泌シグナルを利用して GFP を分泌させ、ビテロジェニン受容体を介したピノサイトーシスを利用して卵母細胞に導入した報告がある (Murakami et al., 2019)。ビテロジェニンは、卵黄形成の際に肝臓から大量に分泌されるため、強力な分泌シグナルであるが、肝臓に EP を行うには、開腹しなければならず技術的な困難が発生する。骨格筋は、EP による遺伝子導入が容易であるが、タンパク質の分泌が活発な組織ではないことが課題となる。骨格筋もマイオカインと呼ばれるホルモンを分泌している (Muñoz-Cánoves et al., 2013)。しかし、ホルモンはビテロジェニンの様に大量に分泌されるものではない。骨格筋でも強力に作用する分泌シグナルを開発する必要がある。また、ゼブラフィッシュに Follicle stimulating hormone (FSH) を投与して卵母細胞におけるビテロジェニンの取り込みを活発にすることで、血液中に分泌された組換えタンパク質の取り込みを促進する方法も考えられる。

水泡眼の骨格筋に EP で遺伝子導入することにより、リンパ液に組換えタンパク質を分泌させることができた。今後、リンパ液中のルシフェラーゼ活性から、リンパ液中の組換えタンパク質の濃度を測定する実験を行うことが期待される。この結果は、水泡眼を用いた新し



い組換えタンパク質合成方法の開発に発展できるものと期待できる。水泡眼のリンパ液中のルシフェラーゼ活性は、ゼブラフィッシュやヒラメと同様に個体間のバラつきがあり、これを減らすための条件検討が必要となる。水泡眼は、脊椎動物であるため、大腸菌や酵母などを用いた組換えタンパク合成と比較して高活性な組換えタンパク質を合成することが期待できる。ニジマス受精卵において、キンギョの LH を合成したという報告がある (Morita et al., 2004)。この報告では、合成された LH が糖鎖修飾されていることが確認されている。水泡眼のリンパ液中に分泌された組換えタンパク質がどのように修飾されているのか解析が必要となる。本研究において、リンパ液中のルシフェラーゼ活性は、分泌型ルシフェラーゼと、GH-Luc 共に、1 週間程度で最大となり次第に減少した。水泡眼では、ゼブラフィッシュやヒラメと異なり、骨格筋における GFP 蛍光も 1 ヶ月程度で減衰しており、骨格筋内における *CMV:secLuc* と *CMV:GH-Luc* の分解が、リンパ液中のルシフェラーゼ活性の低下の原因と考えられる。Blue Native PAGE を利用したルシフェラーゼアッセイで、分泌型ルシフェラーゼのバンドは、検出されたが、GH-Luc のバンドは検出されなかった。GH-Luc のルシフェラーゼ活性は、分泌型ルシフェラーゼよりも低いためコンストラクトの改善などが必要となる。また、リンパ液中への組換えタンパク質の分泌量を増やすための方法を検討する必要がある。EP では、水泡眼の一部の骨格筋にしか遺伝子導入できないため、トランスジェニックの水泡眼を作出し、組織全体で組換えタンパク質を発現・分泌させれば、リンパ液中の組換えタンパク質の濃度を上昇させることが可能となる。また、水泡眼へのホルモン注射により、リンパ液中に高濃度のビテロジェニンを分泌させることが可能であることがわかっている (Matsuda et al., 2011)。メダカを用いて開発された、組換えタンパク質を肝臓から卵母細胞に導入するシステム (Murakami et al., 2019) を水泡眼に導入すれば、肝臓で組換えタンパク質を合成し、リンパ液中に大量に分泌させることが可能となる。しかし、キンギョはゼブラフィッシュのように周年採卵できる魚種ではないため、トランスジェニックの作出は容易ではない。そこで本研究の目的としている顕微注入を用い

ないゲノム編集方法の開発が必要となる。

第一章では、骨格筋からルシフェラーゼを分泌させて、卵母細胞経由で受精卵に導入することに成功した。このことは、卵母細胞にゲノム編集コンストラクトを導入して、卵母細胞内および受精卵内でゲノム編集を実現する上で重要である。本研究で利用した海産魚はヒラメだが、小型の海産魚のササウシノシタは、海産魚のモデル生物としての利用が期待されている (Chen et al., 2017)。今後、水産重要魚種などへの応用を考えると、まずゼブラフィッシュにおいて、顕微注入を用いないゲノム編集技術を開発した後、ササウシノシタを用いて EP などの条件を検討し、顕微注入を用いないゲノム編集技術の改良を行い、その後、多くの養殖対象魚への応用を行う必要がある。先述したように海産魚のゲノム編集では、顕微注入を行う際に種々の問題点があり、本研究においてルシフェラーゼを骨格筋から分泌させて卵母細胞経由で受精卵に導入できたことはそれらを解決するための突破口となる。

## 第二章

卵巣への注射 (IMO: injection into the mother's ovary) による

タンパク質の導入

## 2.1 要旨

第一章では、ゼブラフィッシュの骨格筋から組換えタンパク質を分泌させて受精卵に導入することに成功した。本章では、ゼブラフィッシュの卵巢に直接、組換えタンパク質を注射して卵母細胞および受精卵に導入する方法 (IMO: injection into the mother's ovary) を考案した。魚類の卵母細胞は、成熟する際に大量のビテロジェニンを取り込む。この時期に、IMO で組換えタンパク質を卵母細胞および受精卵に導入できるのではないかと着想した。本研究では、GFP とルシフェラーゼの融合タンパク質の GFP-Luc を IMO により卵母細胞および受精卵の卵黄に導入することに成功した。また、Cas9 ヌクレアーゼとルシフェラーゼの融合タンパク質の Cas9-Luc についても IMO により卵母細胞および受精卵に導入することに成功した。さらに、ゲノム編集の gRNA と Cas9 タンパクの複合体 (RNP) を IMO で卵母細胞および受精卵の卵黄に導入することに成功した。これらの結果から、ゼブラフィッシュの卵母細胞が非特異的にタンパク質を取り込む性質があることが示唆された。しかし、RNP を導入した雌から得た受精卵において、標的遺伝子の *tyrosinase* にゲノム編集による変異は検出されなかった。RNP は、卵黄顆粒に封入されて胚の核に到達しなかったと考えられる。今後、IMO によるゲノム編集を実現化するためには、RNP を卵黄顆粒から解放し、胚の核に移行させてゲノム編集する方法を検討する必要がある。

## 2.2 序論

第一章では、EP を利用して骨格筋から血液に組換えタンパク質を分泌させ受精卵に導入した。しかしながら、EP では一部の細胞にしか遺伝子導入できないため、合成・分泌できるタンパク質の量は少なく、受精卵への導入量も低レベルであると考えられた。本章では、大腸菌を用いて組換えタンパク質を大量に合成して、卵巣に注射 (IMO) する実験を着想した。魚類では、卵母細胞が成熟する際に、肝臓からビテロジェニンが分泌され、受容体を介するピノサイトーシスにより卵母細胞に取り込まれる (Clelland and Peng, 2009)。この時期に、組換えタンパク質を大量に注射すれば、卵母細胞での非特異的な取り込みが期待できる。蚊においては、卵黄タンパク質の部分配列と Cas9 の融合タンパク質を合成し、gRNA と共に胸腔内に注射し、卵母細胞および受精卵に導入してゲノム編集を行ったという報告がある (Chaverra-Rodriguez et al., 2018)。また、メダカにおいてもビテロジェニンの部分配列と GFP の融合タンパク質を肝臓で合成・分泌させ卵母細胞および受精卵に導入するトランスジェニック系統を作出したという報告がある (Murakami et al., 2019)。さらに、水泡眼のビテロジェニンをゼブラフィッシュの卵母細胞や受精卵に導入したという報告もある (Matsuda et al., 2011)。

既に、磁石を利用した遺伝子導入方法であるマグネオフェクション (Holzbach et al., 2010) や超音波を利用した遺伝子導入方法であるソノポレーション (Tomizawa et al., 2013)、in vivo 用の遺伝子導入試薬の利用 (Hine et al., 2012) も報告されており、魚類への応用が期待される。

本章では、IMO で RNP を含む組換えタンパク質を卵母細胞および受精卵に導入することを試みた。

## 2.3 材料と方法

### 2.3.1 実験魚

実験魚は、宮城県仙台市のペットショップで購入したゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュは、「1.3.1 実験魚」に記載した方法により飼育した。ゼブラフィッシュに IMO を行う際や解剖する時は、MS222 で麻酔をかけた。すべての実験は、「東北大学における動物実験等に関する規程」に従って行った。

### 2.3.2 GFP-Luc と Cas9-Luc の合成

大腸菌を用いて GFP-Luc と Cas9-Luc を合成するために *pFN6A-HB-EGFP-Luc-NLS-His vector (GFP-Luc)* と *pET-Cas9-Luc-NLS-His (Cas9-Luc)* の 2 つのベクターを作成した (Fig. 8A, 11A)。これらのベクターは、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs) を用いて作成した。ベクター構築に使用したプライマーの配列と、PCR の鋳型に用いたベクターは表 3 の vector 3、4 に示した。*pGEM-T-Easy-Vg-HB-EGFP-NLS-His* (表 3 の vector 0) の作成は TA クローニングで行った。

GFP-Luc と Cas9-Luc の合成は、上記 2 つのベクターと Single Step (KRX) Competent Cells (Promega) を用いて、付属マニュアルに従って行った。組換えタンパク質の精製には、TALON Metal Affinity Resin (タカラバイオ) を用いた。精製したタンパク質の濃縮およびバッファー交換には、Amicon Ultra-15 10K Centrifugal Filter Devices (Merck, DA, Germany) を用いた。

GFP-Luc と Cas9-Luc の精製を確認するために、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。GFP-Luc には、15 %ゲルを、Cas9-Luc には、5 % ゲルを使用した。電気泳動後に、タンパク質をゲルからニトロセルロースメンブレンにブロットし、Nano-Glo In-Gel Detection System (Promega)を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、Chemi Doc XRS instrument (BioRad, CA, USA).で撮影した。また、精製し

たタンパク質がシングルバンドであることを確認するために、CBB 染色と銀染色を行った。銀染色には、2D-Silver stain reagent II（コスモバイオ、東京都）を使用した。

### 2.3.3 RNP

RNP に使用する crRNA、tracrRNA、Cas9 Nuclease V3 は、Integrated DNA Technology (IDT, IA, USA) から購入した。標的遺伝子は、メラニン合成酵素の *tyrosinase* にした。crRNA の配列は、Kotani *et al.* (2015) で使用していた配列を利用した (Kotani *et al.*, 2015)。tracer RNA は、ATTO 550 で蛍光標識されているものを使用した。crRNA と tracrRNA を 95°C で 5 分間インキュベートし、gRNA を形成させた。その後、gRNA と Cas9 を室温で 10 分間インキュベートして、RNP を形成させた。また、RNP のゲノム編集活性を確認するため、ゼブラフィッシュの受精卵に顕微注入により、RNP を導入し、後述の HMA assay により標的遺伝子の変異導入を検出した。顕微注入は、IDT 社のホームページに記載の Jeffrey Essner 氏のプロトコル ([https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/user-submitted-method/crispr-cas9-rnp-delivery-zebrafish-embryos-j-essnerc46b5a1532796e2eaa53ff00001c1b3c.pdf?sfvrsn=52123407\\_10](https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/user-submitted-method/crispr-cas9-rnp-delivery-zebrafish-embryos-j-essnerc46b5a1532796e2eaa53ff00001c1b3c.pdf?sfvrsn=52123407_10)) に基づいて行った。IMO で導入した RNP のタンパク質濃度や液量は表 4 に示した。

### 2.3.4 Cas9-GFP-Luc の合成

Cas9-GFP-Luc を合成するために、*pET-Cas9-EGFP-Luc-NLS-His* (Fig. 12A) を作成した。ベクター作成に使用したプライマーの配列と、PCR の鑄型に用いたベクターは、表 3 の vector 5 に示した。Cas9-GFP-Luc は、GFP-Luc や Cas9-Luc と同様の方法で精製、濃縮、銀染色した。

### 2.3.5 IMO (Injection into mother's ovary)

成熟した雌のゼブラフィッシュの卵巣にマイクロシリンジ(Hamilton 705RN) で組換えタンパク質を注射した。組換えタンパク質の濃度や液量は、表 4 に示した。

### 2.3.6 写真撮影

ゼブラフィッシュの卵巣や胚の写真は、立体実体顕微鏡 (Leica MZ16F) に付属のデジタルカメラ (Leica DFC500) で撮影した。画像の加工は、Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems) で行った。

### 2.3.7 ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイには、GloMax-Multi+ detection system and Nano-Glo luciferase assay reagent (Promega) を用いた。胚は、PBST 100  $\mu$ L 中でホモジナイズし、luciferase assay reagent 100  $\mu$ L と混ぜてルシフェラーゼアッセイを行った。

### 2.3.8 HMA

RNP によってゲノム編集が行なわれたかどうかを調べるため、hetero duplex mobility assay (HMA) を行った。DNA を抽出は、受精卵に 50 mM NaOH 100  $\mu$ L を加え、95°C で 20 分間加熱した後、1 M Tris-HCl (pH 7.5) を 10  $\mu$ L 加えて平衡化する方法で行った。PCR のプライマー配列を以下に示す。Forward primer は、(Kotani et al., 2015)で使用していた配列を使用し、Reverse primer は研究室で設計した。

Forward primer, 5-GAGTCTGCACCTCCCCAGAAGTC

Reverse primer, 5-CACCAGGACGTCCTGACAGAAC

PCR 産物の長さは、116 bp である。HMA では、PCR 産物を 95°Cで加熱した後、



12℃まで冷却し、15% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。PCR と HMA の条件は、表 5 と表 6 に示した。

### 2.3.9 IMO を用いた種々の物質の受精卵への導入

IMO を利用して、組換えタンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、gRNA (crRNA と ATTO 550 標識 tracr RNA をアニーリングさせたもの) などの物質を受精卵へ導入した。組換えタンパク質では、ゼブラフィッシュのビテロジェニン受容体結合配列である IVTKSKDL (Li et al., 2003) や HiBiT Tag, NLS, His tag を付加した GFP (Vg-HB-GFP)、HiBiT Tag、NLS、His tag のみを付加した GFP (HB-GFP) を作成した。Vg-HB-GFP は、*pFN6A-Vg-HB-EGFP-NLS-His* (表 3 の vector 1) と S30-T7-High-Yield-Protein-Expression-System (Promega)を用いて作成し、Amicon Ultra-0.5 10K Centrifugal Filter Devices (Merck) で精製した。HB-GFP は、*pFN6A-HB-EGFP-NLS-His* (表 3 の vector 2) を用いて GFP-Luc と同様の方法で作成し、精製した。Vg-HB-GFP は、将来的にビテロジェニン受容体結合配列の有無によって、どの程度 IMO による導入効率が改善されるか調べるために作成した。ペプチドは、FAM で蛍光標識していて 21 アミノ酸である。オリゴヌクレオチドは、TAMRA で蛍光標識している 33 b の配列を使用した。

### 2.3.10 受精卵のクロロキン浸漬実験

Chloroquine diphosphate salt (Sigma-Aldrich, MO, USA) を用いて、0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、5 mM、10 mM のクロロキン溶液を作成した。ゼブラフィッシュの受精卵 20 個ずつを各クロロキン溶液に浸漬する実験を行い、翌日の生残率を調べた。

## 2.4 結果

### 2.4.1 GFP-Luc の精製

大腸菌に *pFN6A-HB-EGFP-Luc-NLS-His vector* (Fig. 8A) を導入して、GFP-Luc (49.8 kDa) を発現させ、精製し、濃縮した。GFP-Luc は、HiBiT アッセイや GFP 蛍光、ルシフェラーゼアッセイで検出可能である。濃縮した GFP-Luc から、GFP 蛍光を検出できた (Fig. 8B)。濃縮した GFP-Luc を用いて、CBB 染色やメンブレンを利用したルシフェラーゼアッセイを行うと期待された分子量のバンドを検出できた (Fig. 8B,C)。

### 2.4.2 IMO による GFP-Luc の導入

GFP-Luc (表 4 の Solution 1) を IMO で導入し、1 dpi (day post-injection : 注射後 1 日) で解剖すると、注射した付近の卵母細胞において GFP 蛍光を検出できた (Fig. 9A-C)。また、GFP-Luc を IMO で導入した個体を自然交配させて受精卵を得ると、一部の受精卵において GFP 蛍光を検出できた (Fig. 7D)。GFP-Luc を取り込んでいる受精卵は正常に発生した (Fig. 9E-H)。GFP 蛍光は、卵黄でのみ検出され、胚体細胞質では検出できなかった。また、IMO で GFP-Luc を導入した個体から得た受精卵を用いて 2 日ごとにルシフェラーゼアッセイを行ったところ、4 dpf (days post fertilization: 受精後 4 日) までルシフェラーゼ活性を検出できた。ルシフェラーゼは、GFP よりも検出感度が高いため、GFP 蛍光がない受精卵からも検出できた。6 dpf では、control と同程度の値まで減少していた (Fig. 10)。

### 2.4.3 Cas9-Luc の精製

IMO を用いて Cas9 (160kDa) よりも分子量の大きいタンパク質を導入できるか調べた。Cas9-Luc (Cas9-Luc-NLS-His、180 kDa) を大腸菌を用いて発現し、精製した

(Fig. 11A)。また、銀染色とメンブレンを用いたルシフェラーゼアッセイを行い、Cas9-Luc の産生および精製を確認した (Fig. 11B)。

#### 2.4.4 IMO による Cas9-Luc の導入

IMO で Cas9-Luc (表 4 の Solution 2) を導入した個体 (1 dpi) から得た受精卵 10 個と Cas9-Luc を導入していない個体から得た受精卵 10 個を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 12)。ルシフェラーゼ活性は、Cas9-Luc を導入した受精卵の間に 20 倍程度のばらつきがあった。Cas9 よりも分子量の大きい Cas9-Luc を受精卵に導入できたことは、Cas9 も IMO で受精卵に導入可能であることを示している。

#### 2.4.5 IMO による RNP の導入

IMO を利用して RNP を受精卵に導入できるか調べた。RNP は、gRNA と Cas9 の複合体である。gRNA は、crRNA と ATTO 550 標識の tracr RNA で構成されている (Fig. 13A)。crRNA の標的遺伝子は、*tyrosinase* で標的配列は過去の報告にあった配列を使用した (Kotani et al., 2015)。IMO で RNP (表 4 の solution 3) を導入した個体 (1 dpi) を解剖すると卵母細胞において ATTO 550 の蛍光が検出された (Fig. 13B)。また、IMO で RNP を導入した個体から自然交配によって受精卵を得ると一部の受精卵の卵黄において、ATTO 550 の蛍光が検出された。卵黄で ATTO 550 蛍光が検出できた受精卵は正常に発生した (Fig. 13C-E)。卵黄に ATTO550 蛍光がある受精卵から DNA を抽出して HMA を行った (RNP1~8)。顕微注入で RNP を胚体細胞質に導入した受精卵(Control-P)をポジティブコントロールとして用いた。また、何も導入していない受精卵(Control N1~N2)をネガティブコントロールとして使用した(Fig. 13F)。変異導入は、Control-P でのみ検出され、RNP 1~8 と Control N1~2 では検出されなかつ

た。また、RNP を取り込んでいる受精卵において色素欠損は確認できなかった(Fig. 13E)。これらの結果から、IMO を用いて受精卵に RNP を導入することはできたが、ゲノム編集による変異は導入されなかった。

#### 2.4.6 Cas9-GFP-Luc の精製

本研究で使用している RNP は、gRNA が蛍光標識されているが、モノマーの gRNA を含んでいる可能性がある。Cas9 の局在を正確に知るためには、Cas9 自体を蛍光標識して追跡する必要がある。そこで、Cas9 と EGFP とルシフェラーゼを融合させた Cas9-GFP-Luc (207.2 kDa) を作成した (Fig. 14A)。精製した Cas9-GFP-Luc を Cas9-Luc と共に銀染色し、シングルバンドを検出した (Fig. 14B)。今後、Cas9-GFP-Luc の IMO を行い、受精卵への導入を目指す。

#### 2.4.7 IMO を用いた種々の物質の受精卵への導入

IMO を用いて種々の物質を受精卵に導入できるか調べた。組換えタンパク質では、Vg-HB-GFP や HB-GFP を受精卵に導入できた。また、FAM 標識の 21 アミノ酸のペプチドや TAMRA 標識の 33 b のオリゴヌクレオチド、ATTO 550 標識の gRNA 単体での導入もできた (表 7)。蛍光標識している物質は、いずれも卵黄でのみ蛍光が検出できた。この原因が、導入した蛍光物質が、卵黄顆粒に封入されているのか、蛍光物質と卵黄の脂質との親和性の問題なのか検証が必要である。

#### 2.4.8 受精卵のクロロキン浸漬実験

IMO で導入した RNP は、受精卵の卵黄顆粒に封入されていることが、示唆されたが、ゲノム編集の実現のためには、核ゲノムに到達させる必要がある。蚊においてクロロキンを用いて卵黄顆粒から RNP を解放してゲノム編集を行ったという報告がある (Chaverra-Rodriguez et al., 2018)。そこで、ゼブラフィッシュの受精卵がどの程度の

濃度のクロロキンに耐性があるのか調べた。まず、0.5 mM、2 mM、5 mM、10 mM のクロロキン溶液と control (50 倍希釈した人工海水) にゼブラフィッシュの受精卵 (0dpf) 20 個ずつ浸漬し、1 dpf における生残率を調べた。Control 溶液中では、65%、0.5 mM クロロキン溶液中では、80%、2 mM クロロキン溶液中では、15%の受精卵が生存していた。5 mM と 10 mM のクロロキン溶液中では、すべての受精卵が死亡していた (表 8)。5 mM と 10 mM のクロロキン溶液では、ゼブラフィッシュの受精卵が耐えられないことがわかった。次に 0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2.0 mM のクロロキン溶液と control に採卵した受精卵 (0 dpf) を浸漬し、1 dpf における生残率を調べた。受精卵は、各クロロキン溶液に対して、3 つのシャーレを用意し、それぞれのシャーレに受精卵 20 個ずつ浸漬した。1 dpf における生残率は、control (全体) で 55 %、0.5 mM クロロキン溶液 (全体) で 41.7%、1.0 mM クロロキン溶液 (全体) で 48.3 %、1.5 mM クロロキン溶液 (全体) で 6.7 %、2.0 mM クロロキン溶液 (全体) が 3.3 %であった (表 9)。これらの結果から、クロロキンの濃度は、0.5 mM から 1.0 mM 程度に設定するべきだということがわかった。

## 2.5 考察

ゲノム編集技術は、基礎研究と同様に水産増養殖においても重要なツールである。魚類でのゲノム編集は、受精卵へ顕微注入を行う方法に限られている。しかしながら、養殖対象魚種の受精卵への顕微注入には種々の問題点がある。本研究において、卵巣への注射 (IMO) という非常に単純な方法で、RNP を含む種々の物質を卵母細胞や受精卵の卵黄に導入できることがわかった。IMO を用いることにより、分子量の小さいペプチドやオリゴヌクレオチドから Cas9-Luc (180.1kDa) ような分子量の大きいタンパク質まで導入することが可能であった。

硬骨魚類では、卵黄形成期の卵母細胞は、肝臓から分泌されるビテロジェニンをビ

テロジェニン受容体を介して取り込む性質がある (Tyler et al., 1990)。ビテロジェニンは、卵黄顆粒に蓄積され、ホスビチンとリポビテリンに切断され、胚発生の際にはアミノ酸に分解される (Clelland and Peng, 2009)。卵母細胞では、ビテロジェニンの取り込みの際に非特異的なタンパク質の取り込みが起これと考えている。第一章で示されたようにゼブラフィッシュの骨格筋からルシフェラーゼを分泌させると卵母細胞に非特異的に取り込まれた (Iwaizumi et al., 2020)。IMO で導入した組換えタンパク質は、卵黄形成期の卵母細胞に非特異的に取り込まれ、卵黄顆粒に封入されたと考えられる。IMO で GFP-Luc を導入した場合、受精卵中のルシフェラーゼ活性は、4-6 dpf の間に消失した。受精卵の卵黄に取り込まれた組換えタンパク質は胚発生に伴い次第に分解されていくと考えられる。また、ゼブラフィッシュは 10 日おきに採卵すると受精卵の生存能力が最大となり、その間に卵母細胞は 5 つの発達段階を経て成熟するという報告がある (Clelland and Peng, 2009)。今後は、10 日おきに採卵を行い、IMO による組換えタンパク質の導入効率が最大となるような IMO のタイミングを検討すべきである。また、GFP-Luc を取り込んでいる受精卵の受精卵間のルシフェラーゼ活性のバラつきを把握する必要がある。具体的には、受精卵 100 個程度でルシフェラーゼアッセイを行い、発光値強度の区分を作り、各区分に相当する受精卵の割合を調べる必要がある。その後、IMO に最適な GFP-Luc の量を決定する。

RNP を IMO で導入した場合、受精卵の卵黄で ATTO 550 の蛍光を確認することができたが、細胞質で検出することはできず、ゲノム編集も起きていなかった。RNP は、卵黄顆粒に封入され、胚の核に移動することができなかつたと考えられる。また、今回使用した RNP は、tracr RNA が蛍光標識されており、モノマーの tracr RNA を含んでいる可能性がある。受精卵内の Cas9 の局在を正確に把握するためには、Cas9 自体を蛍光標識する必要があるので、Cas9-GFP-Luc を合成した。今後、IMO で Cas9-GFP-Luc を受精卵に導入する実験を行い、受精卵内の GFP 蛍光とルシフェラー

ぜ活性を測定することで、ゲノム編集を行うのに十分な量の RNP が導入可能か検討する。

IMO を利用してゲノム編集を行うには、RNP を卵黄顆粒から解放して胚の核に移行させる必要がある。蚊においては、クロロキンを用いて卵母細胞内のエンドソームから RNP を解放してゲノム編集を行ったという報告がある (Chaverra-Rodriguez et al., 2018)。また、哺乳類の培養細胞において GALA ペプチド (30 アミノ酸) を用いてエンドソームを破壊したという報告や (Li et al., 2004)、光増感剤を用いてエンドソームを破壊したという報告がある (Minamihata et al., 2015)。今後は、クロロキン、GALA ペプチド、光増感剤などを用いて卵黄顆粒から RNP を解放して胚体の核に移行させる方法を検討していく必要がある。本研究では、蚊において報告のあったクロロキンを用いてゼブラフィッシュ受精卵のクロロキンに対する耐性を調べた。ゼブラフィッシュの受精卵のクロロキン溶液の浸漬実験の結果によると 0.5 mM から 1 mM 程度までは 1 dpf において 40%以上生残することがわかった。今回はクロロキン浸漬実験後の 1 dpf における生残率を調べたが、浸漬時間の条件検討も必要である。その後、RNP を IMO で導入した個体から得た受精卵をクロロキン溶液に浸漬し、RNP が卵黄から胚体核に移行してゲノム編集がおきるか調べる。さらに、マウスなどでは、マグネオフェクションという磁石を利用した遺伝子導入方法も利用されている (Holzbach et al., 2010)。マグネオフェクションでは、マウスに磁気標識したコンストラクトを注射し、導入したい組織の近くに磁石を配置し、遺伝子導入する方法である。磁気標識した RNP を IMO で受精卵に導入し、卵黄に局在している RNP を磁力で胚体細胞質側に移動させることができれば、ゲノム編集が実現する可能性がある。また、ソノポレーションという超音波を利用した遺伝子導入方法もある (Tomizawa et al., 2013)。EP やソノポレーションは、細胞膜に穴を開ける方法なので、受精卵内の卵黄顆粒を破壊し、RNP を解放しゲノム編集することも実現する可能性がある。

IMO を利用すれば種々の物質を受精卵の卵黄に導入できることがわかった。卵母細胞は、組換えタンパク質だけでなくペプチドやオリゴヌクレオチドなども非特異的に取り込むことがわかった。このことは、将来的に IMO を利用して卵母細胞経由でプラスミドや mRNA を導入する実験に役立つ。蛍光標識されている物質が卵黄に局在しているのは、卵黄顆粒に封入されていること以外に、蛍光物質と卵黄の脂質との親和性の問題も考えられる。このことを確認するためには、顕微注入で蛍光標識物質を受精卵の卵黄に導入する実験が必要である。卵黄に顕微注入された物質が、胚側に移行する場合は、IMO で導入した物質は、卵黄顆粒に封入されていると判断できる。顕微注入で卵黄に導入した蛍光物質が、胚の細胞質に移行しない場合は、蛍光物質と卵黄の脂質との親和性の問題が原因と考えられる。

マウスにおいては、in vivo 用の遺伝子導入試薬を用いて、がん細胞に特異的なプロモーターを持つベクターを導入して腫瘍を縮小させたという報告があり(Hine et al., 2012)、魚類への応用により、ゲノム編集の実現も期待できる。

ゼブラフィッシュのビテロジェニン受容体結合配列を付加した Vg-HB-GFP も合成し、IMO で受精卵に導入可能であることがわかった。今後は、ビテロジェニン受容体結合配列の有無によって組換えタンパク質の導入効率にどの程度差があるのか実験を検討していく必要がある。Murakami *et al.* (2019) では、メダカのビテロジェニンの部分配列 300 アミノ酸を利用した組換えタンパク質の合成方法を開発した(Murakami et al., 2019)。本研究で合成した Vg-HB-GFP は、ビテロジェニン受容体結合配列の 8 アミノ酸 (Li et al., 2003) のみ付加されているが、8 アミノ酸よりも長い配列なども試して導入効率の比較なども行いたい。ビテロジェニンの部分配列を付加した方が効率的に組換えタンパク質を導入できる場合は、ビテロジェニンの部分配列を利用したゲノム編集方法も検討していく必要がある。

第二章の実験により、卵への顕微注入を用いずに、受精卵に組換えタンパク質を導



入できることを示した。導入した物質が卵黄顆粒に封入されてしまうなど克服すべき課題はあるが、顕微注入を用いない、卵母細胞経由で受精卵をゲノム編集する方法の実現に近づいたと考えている。

## 総合考察

最近、CRISPR/Cas9 法などのゲノム編集技術は爆発的に普及し、水産増養殖分野においても利用されているが、養殖魚では、受精卵への顕微注入が困難な魚種も少なくない。本研究では、受精卵への顕微注入をせずに親魚の卵母細胞にゲノム編集コンポーネントを導入し、卵母細胞内あるいは受精卵内でゲノム編集することを目的に実験を行った。

第一章では、EP を用いてゼブラフィッシュやヒラメの骨格筋に遺伝子導入を行い、血液へ組換えタンパク質を分泌させてルシフェラーゼ活性で検出することができた。この結果は、将来的に骨格筋から血液へ組換えタンパク質を分泌させ、高成長する個体を作成する方法の開発への応用が期待される。また、ゼブラフィッシュにおいては、骨格筋から血液へ分泌された組換えタンパク質が卵母細胞経由で受精卵に取り込まれていることがわかった。この結果は、将来的に骨格筋から RNP や TALEN を分泌させて受精卵に導入し、ゲノム編集を行う方法の開発への応用が期待される。本研究では、ルシフェラーゼを骨格筋から分泌させて卵母細胞に導入することはできたが、蛍光タンパク質を卵母細胞に導入することはできなかった。今後、強力なプロモーターや分泌シグナルを検討する実験が考えられる。今後ゼブラフィッシュで EP を利用した顕微注入を用いないゲノム編集を確立した次のステップとして、海産魚のモデル生物としての利用が期待されているササウシノシタ (Chen et al., 2017) を用いた実験を行い、その後、養殖対象魚種を利用した実験への応用を検討していく。

水泡眼の骨格筋からリンパ液へ組換えタンパク質を分泌させ、ルシフェラーゼ活性で検出することができた。この結果は、水泡眼を利用した新たな組換えタンパク質の合成方法の開発への応用が期待される。そのためには、リンパ液の組換えタンパク質の濃度が濃くなるように条件検討する必要がある。本研究の目的である顕微注入を用いないゲノム編集が実現すれば、トランスジェニックの水泡眼の作出が可能となり、

EP よりも高濃度の組換えタンパク質の分泌が可能となる。

第二章では、IMO を利用して組換えタンパク質および RNP をゼブラフィッシュの卵母細胞および受精卵の卵黄に導入することができた。GFP-Luc を取り込んだ受精卵のルシフェラーゼ活性は 4 dpf まで持続した。今後は、GFP-Luc の最適な導入量および IMO が最適な時期を検討する必要がある。IMO による RNP の導入では、RNP は卵黄顆粒に封入され、ゲノム編集はできなかった。RNP を卵黄顆粒から解放し、胚体の核に移行させることができれば、ゲノム編集が可能となる。今後、卵黄顆粒を破壊する方法を検討していく必要がある。卵黄顆粒を破壊する方法は、クロロキンなどの薬剤を使用する方法 (Chaverra-Rodriguez et al., 2018) や GALA ペプチド (Li et al., 2004) などのペプチドを用いる方法が考えられる。また、RNP は蛍光標識されているのが、tracr RNA であるため、Cas9 の局在が正確に示されていない可能性については、Cas9-GFP-Luc を IMO で導入して、卵母細胞や受精卵内にゲノム編集を行うのに十分な量の組換えタンパク質を導入できているかどうか確認する必要がある。

第一章と第二章において卵母細胞経由で受精卵に組換えタンパク質を導入することに成功した。顕微注入を用いないゲノム編集の実現には至らなかったが、今後いくつかの課題を克服することによりその実現が期待される。卵母細胞にゲノム編集コンストラクトを導入し、卵母細胞内および受精卵内でゲノム編集する方法が実現すれば、養殖魚におけるゲノム編集は大幅に効率化されることが期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、東北大学大学院農学研究科海洋生命遺伝情報システム学分野の鈴木徹元教授や酒井義文准教授、横井勇人助教には、6年間研究指導していただき、大変感謝しています。同研究科同分野の中嶋正道准教授には、プレゼンの指導などでお世話になりました。また、副査を担当していただいた同研究科水圏動物生理学分野の尾定誠教授や沿岸生物生産システム学分野の池田実教授、電気泳動の電源装置を貸していただいた長澤一衛助教には、心から感謝しています。さらに、私を支えてくださったすべての研究室のメンバーに深く感謝申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員制度 (DC1) の特別研究員奨励費 (18J20434) の援助により行いました。感謝の意を表します。

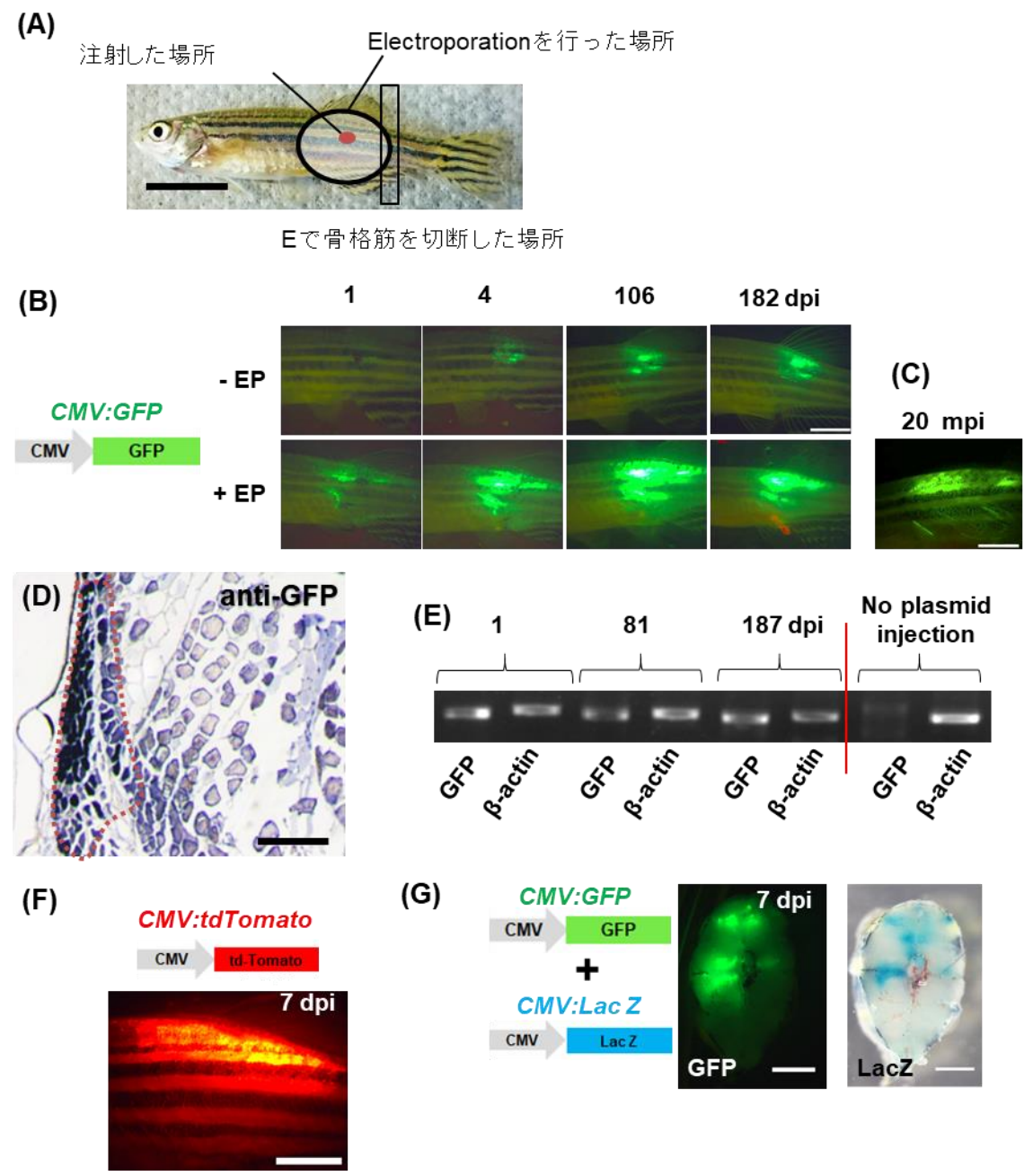


Fig. 1 EP を利用したゼブラフィッシュ骨格筋へのレポーター遺伝子の導入。

(A) プラスミド溶液の注射および EP を行った場所。(B) 182 日間の骨格筋における GFP 蛍光の継続的観察。(−EP) は、プラスミド溶液の注射のみ。(＋EP) は、プラスミド溶液の注射と EP を行っている。dpi (days post-injection: 注射後の日数)。(C) EP から 20 か月後の GFP 蛍光。mpi (months post-injection: 注射後の月数)。(D) 抗 GFP 抗体を用いた骨格筋切片の免疫染色。赤の破線で囲まれた部分が抗体への陽性反応を示している。(F) 骨格筋における tdTomato の蛍光観察。(E) PCR による骨格筋内の *CMV:GFP* の検出。 $\beta$ -actin は、DNA 抽出のポジティブコントロールとして使用した。(G) 骨格筋への *CMV:GFP* と *CMV:LacZ* の共導入。7 dpi の時点で(A)の場所で骨格筋を切断して GFP 蛍光の観察と X-gal 染色を行った。スケールバー＝ (A) は 1 cm、(B)、(C)、(F)は 3 mm、(D) は、0.2 mm、(G) は、1 mm。

Fig. 2

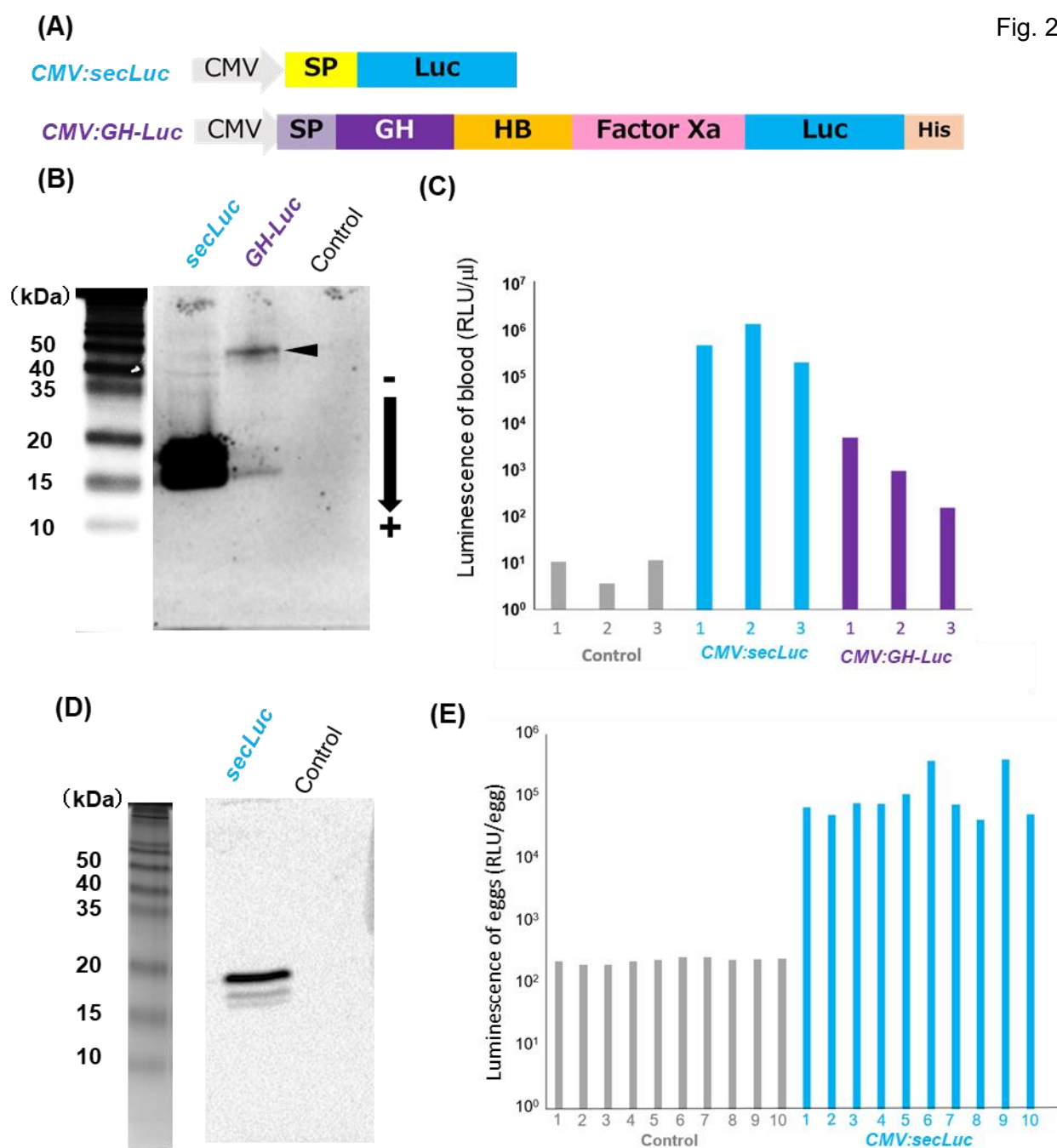


Fig. 2 EP によるゼブラフィッシュ骨格筋への *CMV:secLuc* および *CMV:GH-Luc* の導入。(A) *CMV:secLuc* および *CMV:GH-Luc* の構造。Factor Xa: FactorXa 認識・切断配列、GH: トラフグ成長ホルモン、HB: HiBiT タグ、His: 6×His tag、Luc: ルシフェラーゼ、SP: 分泌シグナル。(B) ルシフェラーゼ活性による骨格筋に発現させたタンパク質のバンドの検出。*CMV:secLuc* あるいは *CMV:GH-Luc* を骨格筋に導入した個体 (7 dpi) の骨格筋ライセートを用いて SDS-PAGE を行い、ゲル中でルシフェラーゼアッセイを行った。推定分子量は、*secLuc* が 21.9 kDa、*GH-Luc* が 48.2 kDa である。矢頭は、*GH-Luc* のバンドを示している。(C) 血液を用いたルシフェラーゼ活性。遺伝子導入していない control と EP で *CMV:secLuc* を導入した個体 (7 dpi) および *CMV:GH-Luc* (7 dpi) を導入した個体の血液を使用した。(D) ルシフェラーゼ活性による卵巣に取り込まれたタンパク質のバンドの検出。骨格筋に *CMV:secLuc* を発現させた成熟した雌のゼブラフィッシュ (7 dpi) の卵巣ライセートを用いて SDS-PAGE を行い、ゲル中でルシフェラーゼアッセイを行った。Control は、遺伝子導入を行っていない個体の卵巣ライセート。(E) 受精卵を用いたルシフェラーゼアッセイ。遺伝子導入していない個体から得た control の受精卵と骨格筋に *CMV:secLuc* を発現させた成熟した雌のゼブラフィッシュ (7 dpi) から得た受精卵を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。(C) の 1~3 は、個体番号、(E) の 1~10 は、受精卵の番号を表している。



(A)

**CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg**

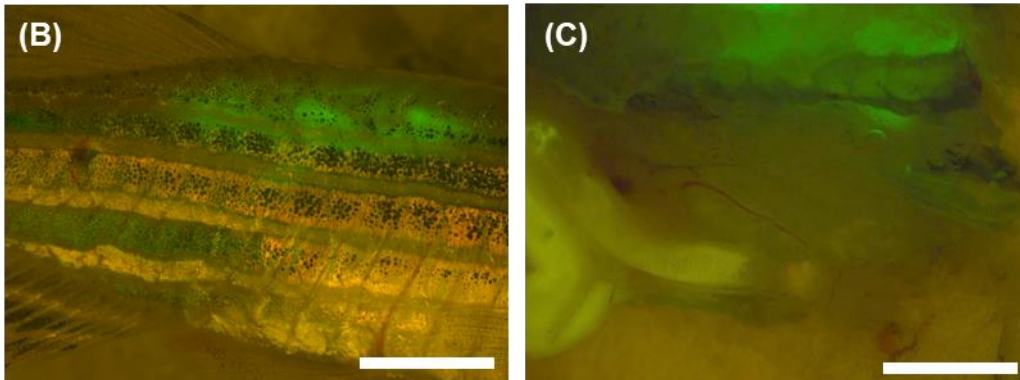


Fig. 3 ゼブラフィッシュ骨格筋への *CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg* の導入。(A) *CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg* の構造。CMV: CMV プロモーター、EGFP: enhanced GFP、HB: HiBiT タグ、NLS: nuclear localization signal of SV40 (核移行シグナル)、SP: 分泌シグナル、Vg: ビテロジェニン受容体結合配列。(B) *CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg* を導入した個体 (7 dpi) の骨格筋における GFP 蛍光。(C) *CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg* を導入した個体 (7 dpi) の卵巣を解剖した様子。スケールバー= (B)、(C)は、3 mm。

(A)

**CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg**

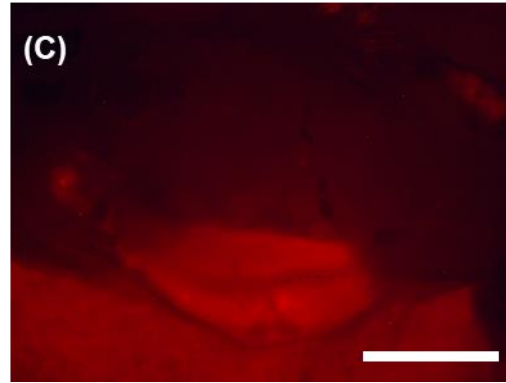
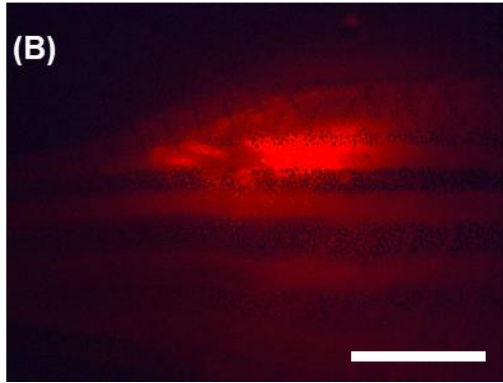


Fig. 4 ゼブラフィッシュ骨格筋への *CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* の導入。(A) *CMV-SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* の構造。CMV: CMV プロモーター、HB: HiBiT タグ、NLS: nuclear localization signal of SV40 (核移行シグナル)、SP: 分泌シグナル、tdTomato: 赤色蛍光タンパク質、Vg: ビテロジェニン受容体結合配列。(B) *CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* を導入した個体 (7 dpi) の骨格筋における GFP 蛍光。(C) *CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg* を導入した個体 (7 dpi) の卵巣を解剖した様子。スケールバー= (B)、(C)= 3 mm。

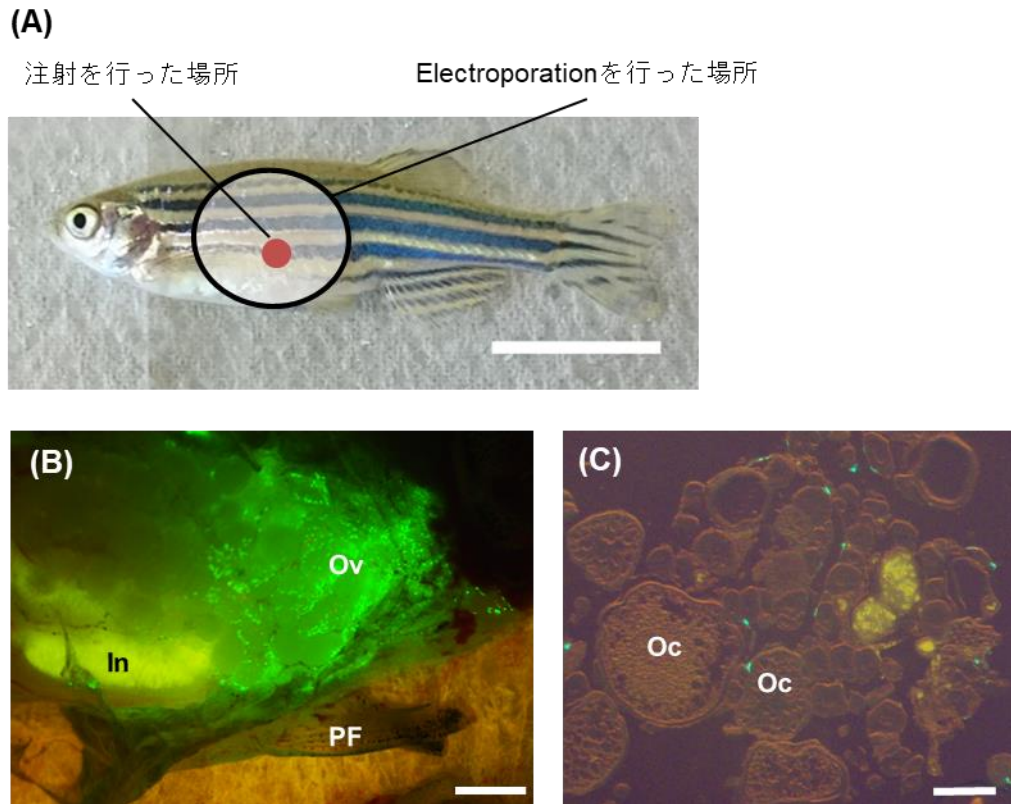


Fig. 5 EP を用いた *CMV:GFP* の卵巣への導入。(A) *CMV:GFP* の注射および EP を行った場所。(B) 卵巣内の GFP 蛍光。卵巣に *CMV:GFP* を導入した個体 (7 dpi) を解剖し、卵巣を観察した。(C) 卵巣切片の免疫染色。*CMV:GFP* を導入した卵巣を用いて切片を作成し、抗 GFP 抗体と Alexa 488 標識 2 次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

In (intestine: 腸)、Oc (oocyte: 卵母細胞)、Ov (ovary: 卵巣)、PF (pelvic fin: 腹鰭)

スケールバー＝ (A) は 1 cm、(B) は 1 mm、(C) は 0.2 mm。

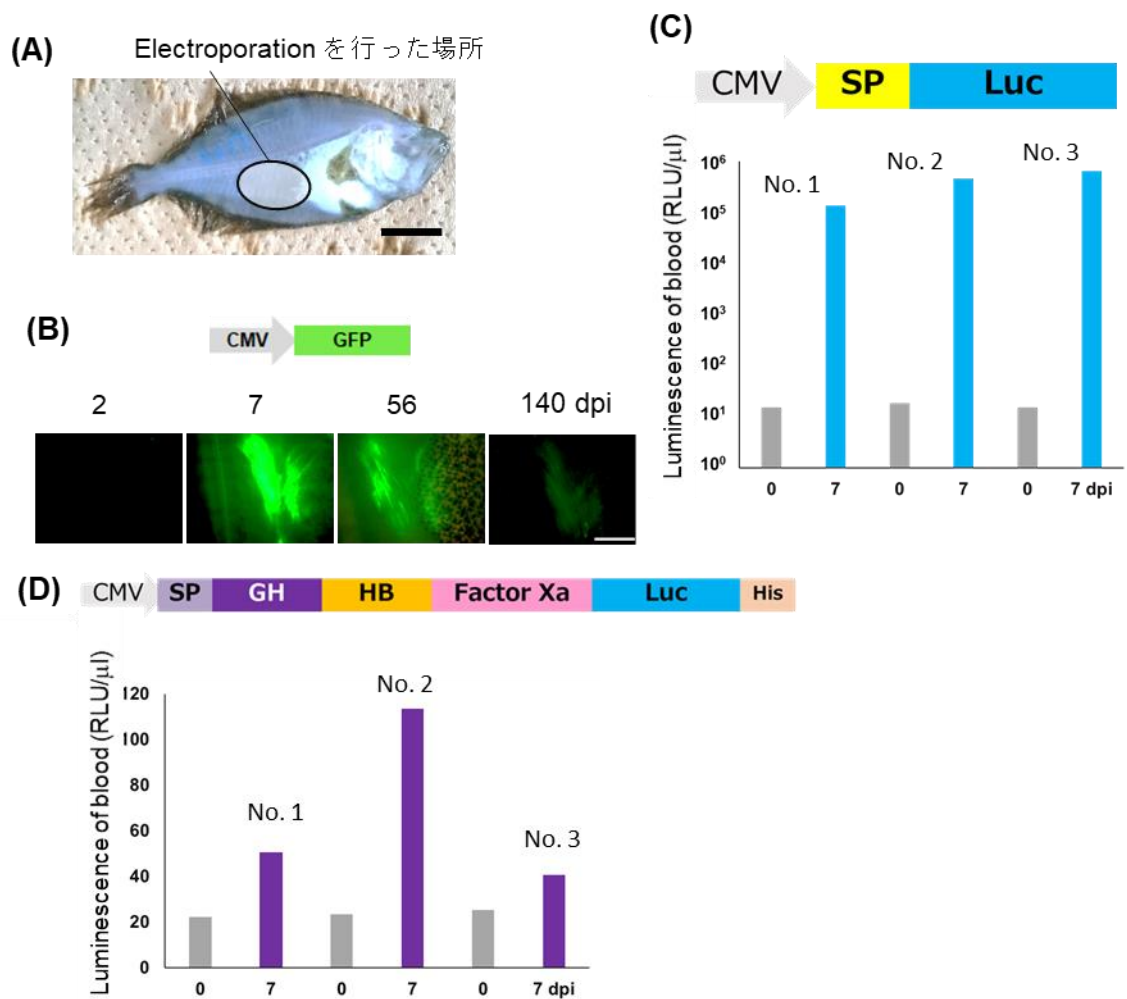


Fig. 6 ヒラメ稚魚の骨格筋への EP による遺伝子導入。(A) EP を行った場所。(B) 140 日間の骨格筋における GFP 蛍光の観察。(C)、(D) 血液を用いたルシフェラーゼ活性。  
 CMV:secLuc を導入した個体および CMV:GH-Luc を導入した個体の EP 前 (0 dpi) と EP 後 (7 dpi) の血液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。No. 1,2,3 は、個体番号を表している。スケールバー= (A) は 1 cm、(B) は 3 mm。

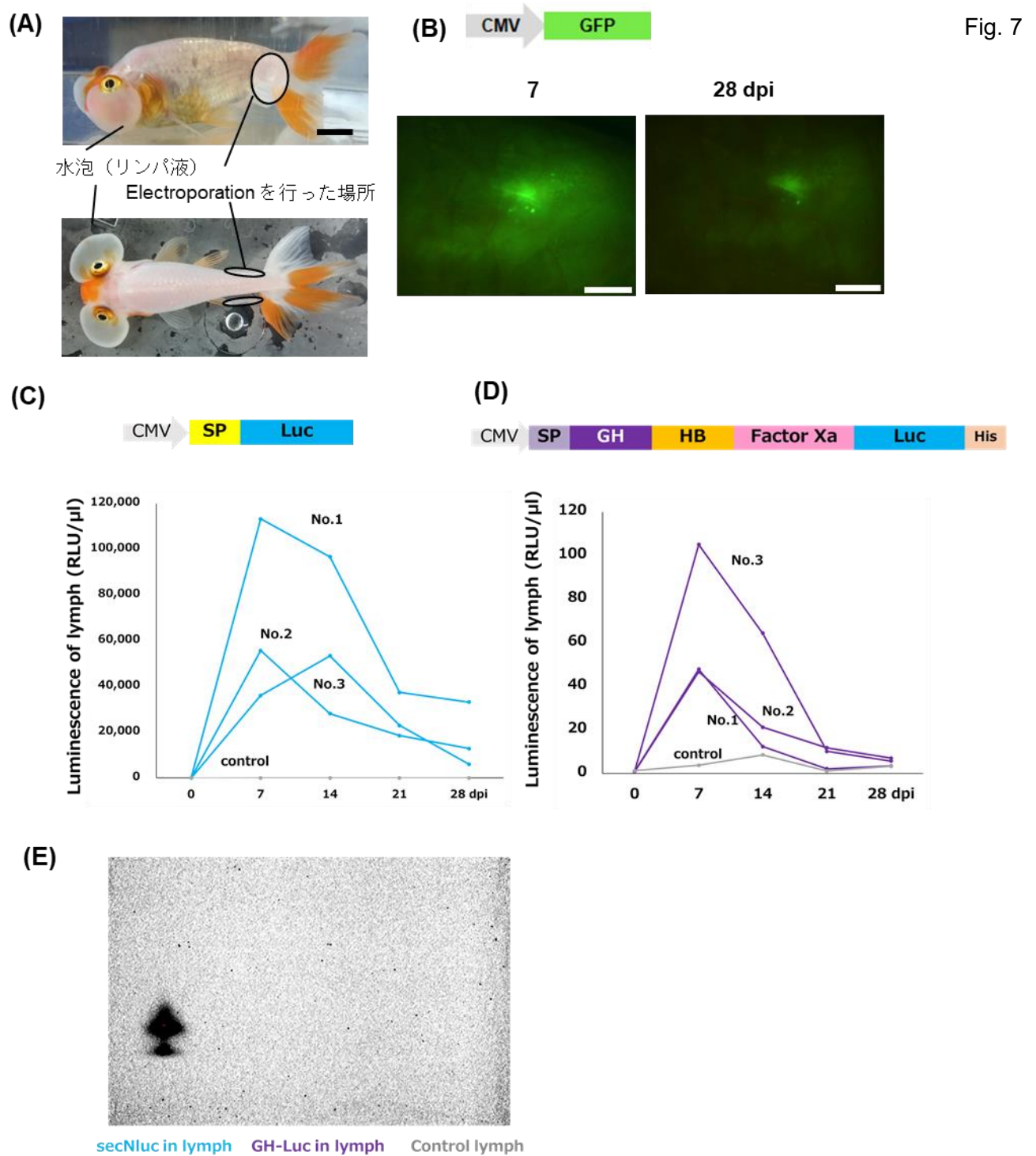


Fig. 7

Fig. 7 EP を利用した水泡眼骨格筋への遺伝子導入。(A) リンパ液で満たされた水泡および EP を行った場所。(B) 骨格筋における GFP 蛍光の観察。(C)、(D) リンパ液を用いた経時的なルシフェラーゼアッセイ。*CMV:secLuc* を導入した個体および *CMV:GH-Luc* 個体の EP 前 (0 dpi) と EP 後 (7~28 dpi) のリンパ液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。No. 1,2,3 は、個体番号を表している。(E) ルシフェラーゼ活性を利用したリンパ液中の組換えタンパク質のバンドの検出。スケールバー= (A) は 1 cm、(B) は 1 mm。

# 第一章 表

表 1 ベクター合成に用いたプライマーの配列

Synthesized vector	Primer	primer sequence	Template
CMV:td-tomato	td-tomato F	CAGGATCCCATCGATTGGAAGAGATCCCGCCACCATGGTGAG CAAGGCGAGGAG	pBluescriptII-tdTomato
	td-tomato R	TCTAGAGGCTCGAGAGGCCCTTAGAGTCGCGGCCAATTCCTTAC TTGTACAGCTCGT	
	pCS2 F	AGGCCTCTCGAGCCTCTAGAACTATAGTGAGTCGTATTAC	
	pCS2 R	TTCGAATCGATGGGATCCTGCAAAAAGAACAGTAGCTTG	
CMV:GH	pufferfish GH F	GAAGCAGACGAACAATGGAC	Takifugu GH
	pufferfish GH R	GGTTAAGACTGCAGTTGGC	
	pufferfish GH TOPO F	AGCAGAGCCACCATGGACAA	
CMV:GH-His tag	pufferfish GH TOPO R	AAGAGTGCAGTTGGCTTCAG	CMV:GH
	pufferfish GH HB F	AGTGTGGTGAATTGCCCTT	
	pufferfish GH HB R	GCTAATCTTCTTGACAGCCGCCAGCCGCTCACAAAGAGTGCA GTTGGCTTCAG	
CMV:GH-HiBiT tag	pcDNA3.1V5/His F	GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAGAAGATTAGCAAGGGCAAT TCTGCAGATAT	CMV:GH-His tag
	pcDNA3.1V5/His R	AAGGGCAATTCCACCACACT	
	Nanoluciferase F	GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAGAAGATTAGCATCGAAGGG CGCGGAGCTCCGGTGTCTTCACACTCGAAGATTTCGTTGG GGACTGGGACAGAC	
	Nanoluciferase R	CTGTGCTGGATATCTGCAGAAATTGCCCTTACCGGAGCTCCCC GCCAGAAATGCGTTTCGCACAGCCGCCAGCCGGTCACTCCGTT GATGGTTAC	
CMV:GH-Luc	pcDNA3.1V5/His HB F	AAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACAG	CMV:GH-HiBiT tag
	pcDNA3.1V5/His HB R	GCTAATCTTCTTGACAGCCGCCAGCCGCTCAC	
	pCS2-F2	ATTGTGACAAAGTCTAAAGATCTGTAAAGGCCCTCTCGAGCCTC TAGAACTATAGTGATCGT	
	pCS2-R2	TTCGAATCGATGGGATCCTGCAAAAAGAACAAAGTA	
CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg	pNL1.3 F	CAGGATCCCATCGATTGGAAGTAAAGCCACCATGAACCTCCTTC TCCACAAGCGCC	pNL1.3
	pNL1.3 R	GCTAATCTTCTTGACAGCCGCCAGCCGCTCACTGGGGCAGG GAAGGCAGCAGGCACACAGGAGCA	
	HiBiT-EGFP-F	GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAGAAGATTAGCGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGT	
	HiBiT-EGFP-R	TCTTTAGACTTTGTACAATCACCTTCTCTTCTTCTTGGGCT TGTACAGCTCGTCCATGC	
	pCS2-F3	GCATGGACGAGCTGTACAAGCCCAAGAAAGAGGAAGGTGA TTGTGACAAAGTC	
	pCS2 R3	ACCTCCTCGCCCTTGCTCAGGCTAATCTTCTTGAACAGCCGC CAGCCGCTCACTG	
CMV:SP-HB-td-tomato-NLS-Vg	td-tomato F2	GTGAGCAAGGGCGAGGAGGTC	CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg
	td-tomato R2	CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTAC	
			pBluescriptII-tdTomato

表 2 Electroporation の条件

Experiment	Species	Vector	Volume ( $\mu$ g)	Voltage [V]
Exp-1	Zebrafish	<i>CMV:GFP</i>	5	50
Exp-2	-	<i>CMV:td-tomato</i>	5	50
Exp-3	-	<i>CMV:GFP+CMV:LacZ</i>	5+5	50
Exp-4	-	<i>CMV:GFP+CMV:secLuc</i>	5+5	50
Exp-5	-	<i>CMV:GFP+CMV:GH-Luc</i>	5+5	50
Exp-6	-	<i>CMV:SP-HB-EGFP-NLS-Vg</i>	10	50
Exp-7	-	<i>CMV:SP-HB-tdTomato-NLS-Vg</i>	10	50
Exp-8	Flounder	<i>CMV:GFP</i>	5	30
Exp-9	-	<i>CMV:GFP+CMV:secLuc</i>	10+10	30
Exp-10	-	<i>CMV:GFP+CMV:GH-Luc</i>	10+10	30
Exp-11	Goldfish	<i>CMV:GFP</i>	10	100
Exp-12	-	<i>CMV:GFP+CMV:secLuc</i>	10+10	100
Exp-13	-	<i>CMV:GFP+CMV:GH-Luc</i>	10+20	100

Voltage 以外の条件は、下記の条件で行った。

pulse length = 50 msec, puls interval = 999 msec, number of pulses = 1, polarity =  $\pm$ .



## 第二章 図

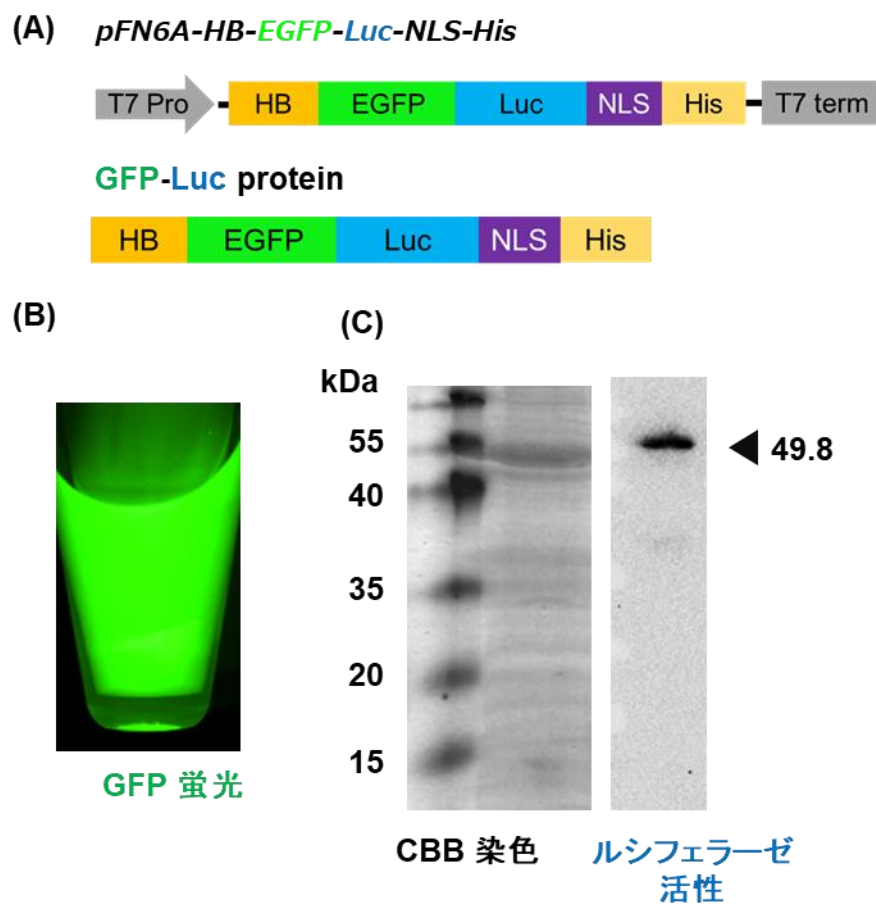


Fig. 8 GFP-Luc の合成。 (A) *pFN6A-HB-EGFP-Luc-NLS-His* および GFP-Luc の構造。

EGFP: enhanced GFP、HB: HiBiT タグ、His: 6×His tag、Luc: ルシフェラーゼ、NLS: nuclear localization signal of SV40 (核移行シグナル)、T7 Pro: T7 プロモーター、T7 terminator: T7 ターミネーター。 (B)、(C) 大腸菌から精製した GFP-Luc。 (B) GFP 蛍光。 (C) CBB 染色とメンブレンを用いたルシフェラーゼアッセイ。

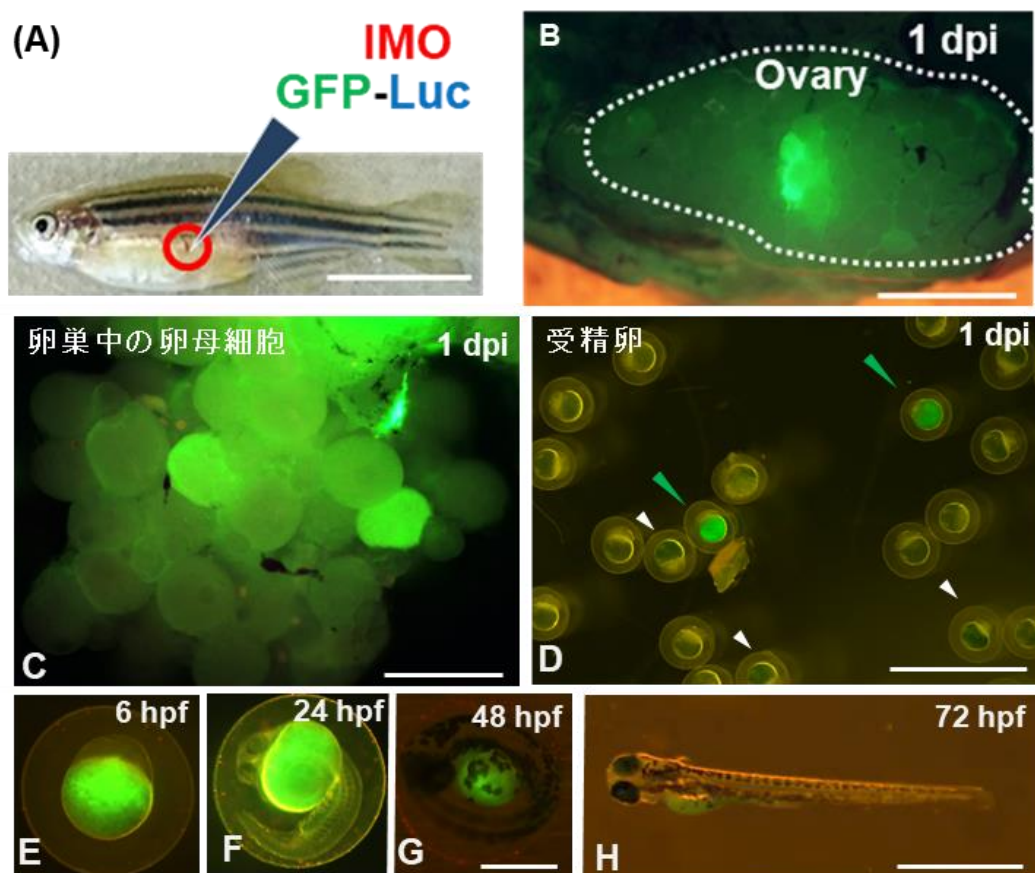


Fig. 9 IMO による GFP-Luc の卵母細胞および受精卵への導入。

(A) IMO による成熟した雌への GFP-Luc の注射。(B) IMO で GFP-Luc を導入した卵巣(1 dpi)。(C) GFP-Luc を取り込んでいる卵巣と卵母細胞 (1 dpi)。(D) IMO で GFP-Luc を導入した個体から得た受精卵。緑色の矢印は、GFP 蛍光の強い受精卵を示しており、白色の矢印は、GFP 蛍光の弱い受精卵を示している。(E)、(F)、(G)、(H) GFP-Luc を取り込んだ受精卵の胚発生。hpf : (hours post-fertilization: 受精後時間)。スケールバー＝ (A) は 1 cm、(B)、(D) は 3 mm、(C)、(H) は 1 mm、(E)、(F)、(G) は 0.5 mm。

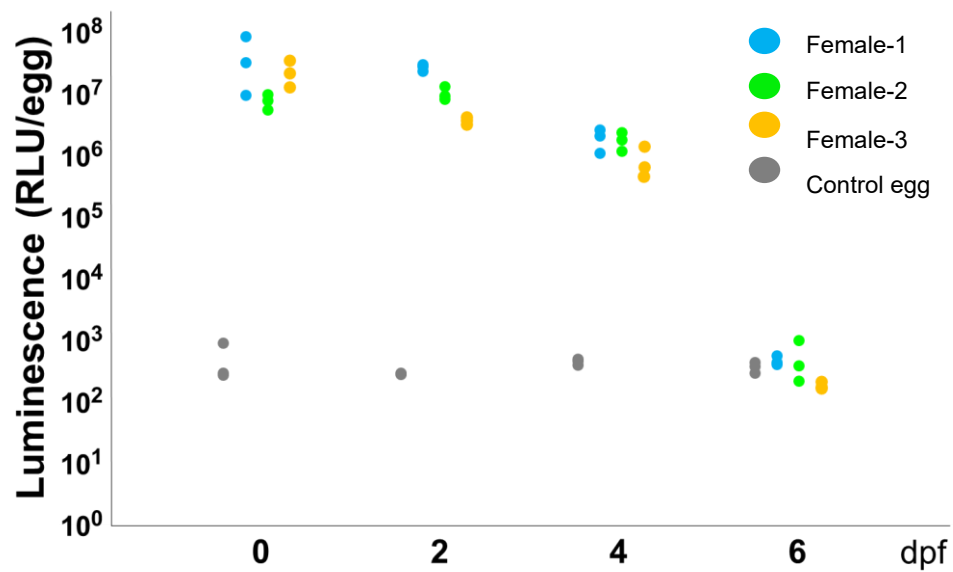


Fig. 10 IMO で GFP-Luc を導入した個体から得た受精卵のルシフェラーゼ活性。IMO で GFP-Luc を導入した 3 個体の雌から受精卵を得て継時的にルシフェラーゼアッセイを行った。Control は、GFP-Luc を導入していない個体から得た受精卵。(days post-fertilization: 受精後日数)。

(A)

*pET-Cas9-Luc-NLS-His*



**Cas9-Luc protein**



(B)

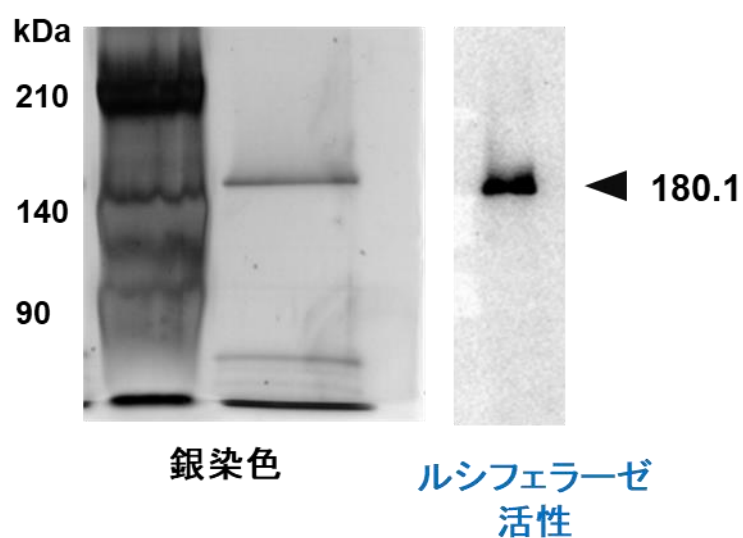


Fig. 11 Cas9-Luc の生成。(A) *pET-Cas9-Luc-NLS-His* および Cas9-Luc の構造。 Cas9: Cas9ヌクレアーゼ、EGFP: enhanced GFP、HB: HiBiT タグ、His: 6×His tag、Luc: ルシフェラーゼ、NLS: nuclear localization signal of SV40 (核移行シグナル)、T7 Pro: T7 プロモーター、T7 terminator: T7 ターミネーター。(B) Cas9-Luc の銀染色とメンブレンを用いたルシフェラーゼアッセイ。

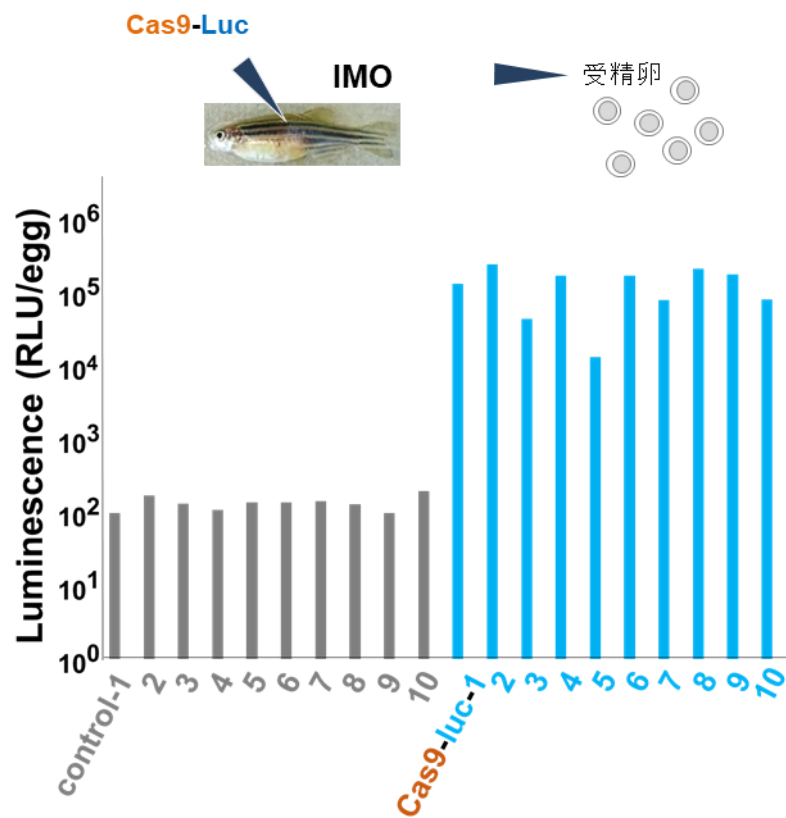


Fig. 12 IMO で Cas9-Luc を導入した個体から得た受精卵のルシフェラーゼアッセイ。Control は、Cas9-Luc を導入していない個体から得た受精卵。1~10 は、受精卵の番号を示している。

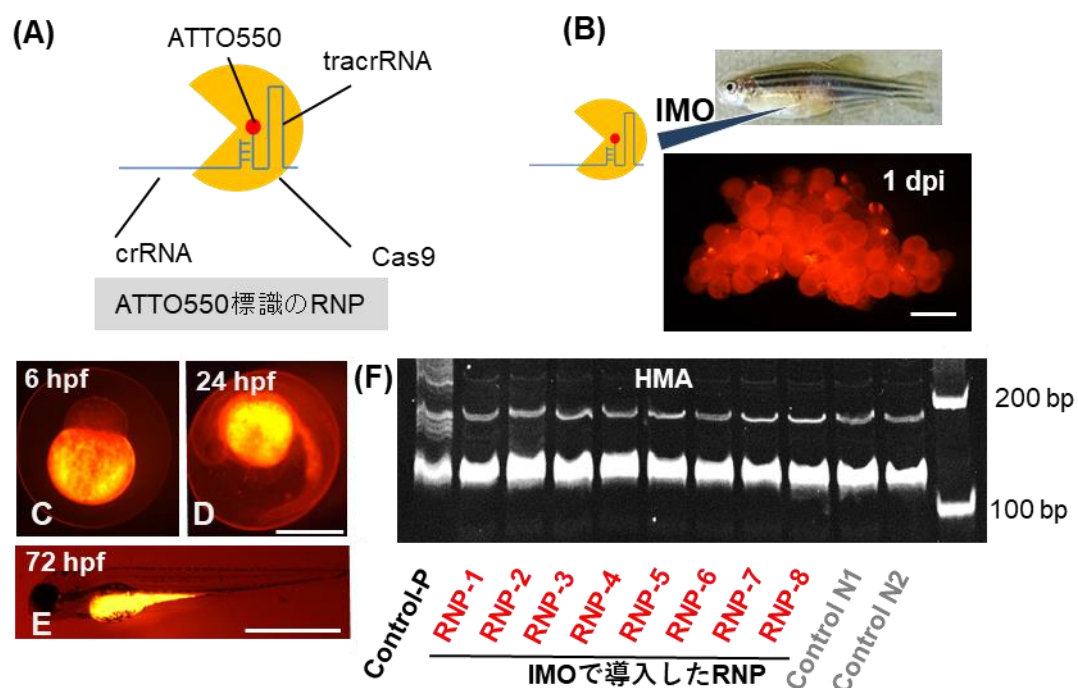


Fig. 13 IMO による RNP の導入。(A) ATTO550 標識の RNP の構造。crRNA の標的遺伝子は、*tyrosinase* である。(B) IMO で RNP を導入した卵巣 (1 dpi)。(C)、(D)、(E) IMO で RNP を導入した個体から得た受精卵の胚発生。卵黄で ATTO 550 の蛍光が検出できた。(F) HMA による変異導入の有無の判定。Control-P: 顕微注入で RNP を導入した受精卵 (2 dpf)。RNP 1~8 : IMO で RNP を導入した受精卵 1~8 (2 dpf)。Control N1~2: RNP を導入していない個体から得た受精卵 (2 dpf)。1~2、1~8 は受精卵の番号を表している。スケールバー=(B)、(E) は 1 mm、(C)、(D) は 0.5 mm。

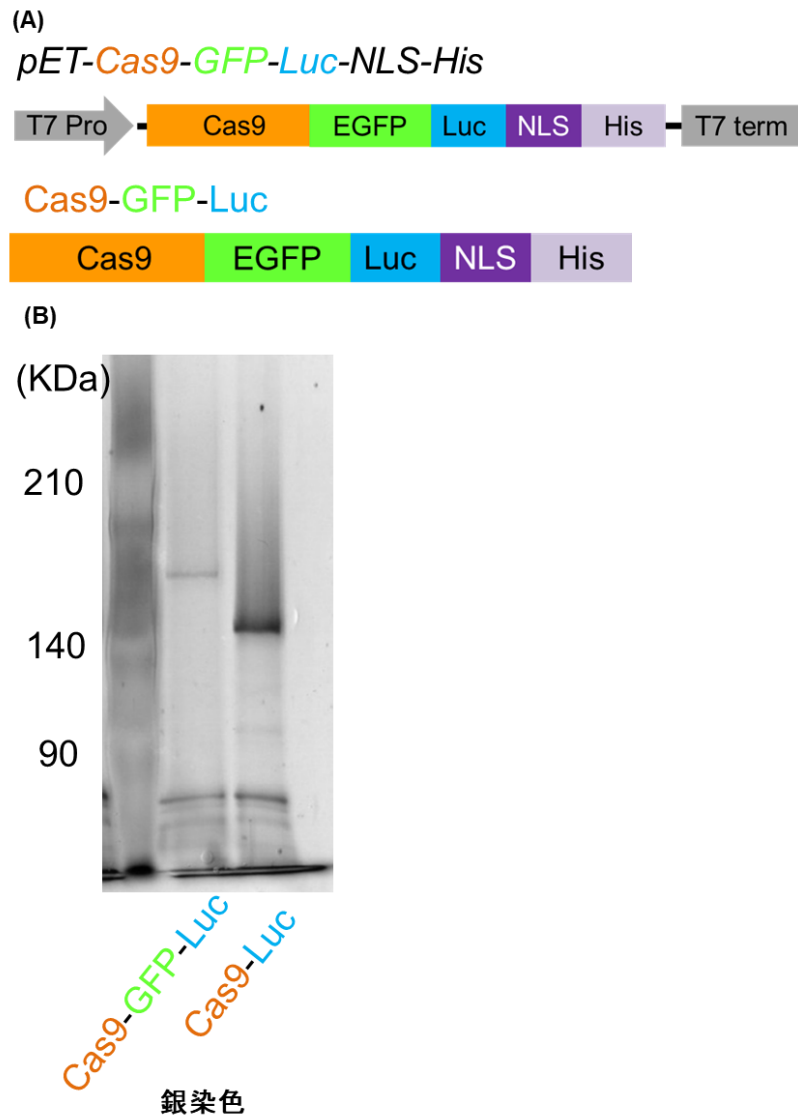


Fig. 14 Cas9-GFP-Luc の生成。(A) *pET-Cas9-EGFP-Luc-NLS-His* と Cas9-Luc の構造。

Cas9: Cas9ヌクレアーゼ、HB: HiBiT タグ、His: 6×His tag、Luc: ルシフェラーゼ、NLS: nuclear localization signal of SV40 (核移行シグナル)、T7 Pro: T7 プロモーター、T7 terminator: T7 ターミネーター。(B) Cas9-GFP-Luc (207.2 kDa) と Cas9-Luc (180.1kDa) の銀染色。

表 3 ベクター合成に用いたプライマーの配列

Vector No.	Synthesized vector	Primer	primer sequence	Template
0	<i>pGEM-T-Easy-Vg-HB-EGFP-NLS-His</i>	Vg-GFP-F	CTTTACTAAGGAGAATTACCATTGATTTGTCACAAGTCTAAAGATCTGGTGAGCGGC	CMV-SP-HB-EGFP-NLS-Vg
		Vg-GFP-R	TGGCGCTGTTCAAGAAG CTAATGTTGATGGTGCGCCCTTCGATCACCTTCCTCTTCTTCTTGGGCT TGTACAGCTCGTCCATGC	
		pFN6A-F	CATTAGAATCACTAGTGAATTCGCAACGAATTCGGGCTCGGTACCCGGGGATCCTC TAGAGTC	
1	<i>pFN6A-Vg-HB-EGFP-His</i>	pFN6A-R	GCCGCTCACCAGATCTTTAGACTTTTGTACAATCATGGTGAATTCCTTTAGTAAAGT TAAATTCCTATAGTG	S3077 control DNA
		Vg-GFP-F	CTTTACTAAGGAGAATTCACCATGATTTGTGACAAGTCTAAAGATCTGGTGAGCGGC	
		Vg-GFP-R2	TGGCGCTGTTCAAGAAG	
		pFN6A-F2	GTACCGAGCCGAATTCGTTTCCGAATTCACGTGATTCTAATG	
		pFN6A-R2	TCCTTCAAGGACGCGCAACTACAAGAC	
2	<i>pFN6A-HB-EGFP-NLS-His</i>	GFP-F	GGTGAATTCCTCTAGTAAAGTTAAATTTGCCTATAGTG	<i>pGEM-T-Easy-Vg-HB-EGFP-NLS-His</i>
		GFP-R	CACATATAGCAATTTTAACCTTTACTAAGGAGAATTCACCATGGTGAGCGGCTGGCGG CTGTTCAAGAAGATTAGC	
		pFN6A-GFP-F	GGGAGCTCCGGTCCCAAGAAGAGGAGGTGATCGAAGGGCGCCACCATCACCA TCACCATTAGAAACGAATTCGGCTCGGTACCCG	
		pFN6A-GFP-R	GTCCCAACGAATCTTCGAGTGTGAAGACACCGGAGCTCCCTTTGTACAGCTCGT CCATGCCGAGAGTGATC	
3	<i>pFN6A-HB-EGFP-Luc-NLS-His</i>	Nluc F	GTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGCGACAGA	<i>pNL1.3</i>
		Nluc R	CTTCTTGGGACCGGAGCTCCCGCCGAGAAATGCGTTCGCACAGCCGC	
		pET-Cas9-F	TAGAAACGAATTCGGGCTCGGTACCGTGATAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCG	
		pET-Cas9-R	GTCACTCCTAGCTGACTCAATCAATGCG	
4	<i>pET-Cas9-Luc-NLS-His</i>	Nluc F2	CGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACGGGAGCTCCGGTGTCTTCACACTCGAA	<i>pFN6A-HB-EGFP-Luc-NLS-His</i>
		Nluc R2	CGGGTACCGAGCCCGAATTCGTTTCTA	
		Nluc F	GTCTTCACACTCGAAGATTTTCGTTGGGGACTGGCGACAGA	
		pET-Cas9-R	GTCACTCCTAGCTGACTCAATCAATGCG	
5	<i>pET-Cas9-EGFP-Luc-NLS-His</i>	Cas9-GFP-F	CGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACGGGAGCTCCGGTGTGAGCAAGGGCG AGGAGCTGTTACCGGG	<i>pET-Cas9-Luc</i>
		pFN6A-GFP-R	GTCCCAACGAATCTTCGAGTGTGAAGACACCGGAGCTCCCTTTGTACAGCTCGT CCATGCCGAGAGTGATC	



表 4 IMO に使用した溶液の組成

Species	Solution number	Protein	Concentration	Volume (μl)
zebrafish	Solution 1	GFP-Luc	6 μg/μl	40
	Solution 2	Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA	100 μM	6
		Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA, ATTO 550	100 μM	6
		Cas9-Luc	3.5 μg/μl	27
	Solution 3	Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA	100 μM	6
		Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA, ATTO 550	100 μM	6
		Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3	62 μM	9.6

表 5 *tyrosinase* のジェノタイピングのための PCR の条件


	temperature (°C)		time (min)	time (sec)
STEP 1	94	 × 39	3	0
STEP 2	98		0	10
STEP 3	55		0	30
STEP 4	68		0	5
STEP 5	68		10	0
STEP 6	12		10	0

表 6 *tyrosinase* のジェノタイピングのための HMA の条件

	templat <sup>ure</sup> (°C)	time (min)	time (sec)
STEP1	95	5	0
STEP2	85	0	10
	84	0	10
	83	0	10
	∫	∫	∫
	25	0	10
STEP 3	12	∞	∞

表 7 IMO で導入した種々の物質

	物質名	分子量	検出方法
Protein	Vg-HB-GFP	31.3 KDa	Fluorescence
	HB-GFP	30.4 kDa	Fluorescence
	GFP-Luc	49.8 kDa	Fluorescence Luc activity
	Cas9-Luc	180.1 kDa	Luc activity
Peptide	FAM-labeled 21 aa peptide	2.9 kDa	Fluorescence
Oligo nucleotide	Tam-33 b oligo DNA	33 b	Fluorescence
gRNA	Duplexed crRNA and ATTO 550-tracr RNA	crRNA: 36 b	Fluorescence
		tracr RNA : 67 b	

表 8 受精卵のクロロキン浸漬実験 ①

クロロキン溶液の濃度 (mM)	0	0.5	2.0	5.0	10.0
浸漬した受精卵の数	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
1 dpfにおける生残している受精卵数	13.0	16.0	3.0	0.0	0.0
1 dpfにおける生残率 (%)	65.0	80.0	15.0	0.0	0.0

0 mM は、control 溶液である。

表 9 受精卵のクロロキン浸漬実験 ②

クロロキン溶液の濃度 (mM)	シャーレ	0	0.5	1.0	1.5	2.0
浸漬した受精卵の数	1	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
	2	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
	3	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
1 dpfにおける生残している受精卵数	1	10.0	6.0	9.0	1.0	1.0
	2	12.0	11.0	11.0	0.0	0.0
	3	11.0	8.0	9.0	3.0	1.0
1 dpfにおける受精卵の生残率 (%)	1	50.0	30.0	45.0	5.0	5.0
	2	60.0	55.0	55.0	0.0	0.0
	3	55.0	40.0	45.0	15.0	5.0
1 dpf生残している受精卵数 (全体)		33.0	25.0	29.0	4.0	2.0
1 dpfにおける受精卵の生残率 (全体)		55.0	41.7	48.3	6.7	3.3

0 mM は、control 溶液である。

## 引用文献

- Babaei, F., Ramalingam, R., Tavendale, A., Liang, Y., Yan, L.S., Ajuh, P., Cheng, S.H., Lam, Y.W., 2013. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish. *J Proteome Res* 12, 1580-1590.
- Burket, C.T., Montgomery, J.E., Thummel, R., Kassen, S.C., LaFave, M.C., Langenau, D.M., Zon, L.I., Hyde, D.R., 2008. Generation and characterization of transgenic zebrafish lines using different ubiquitous promoters. *Transgenic Res* 17, 265-279.
- Callahan, S.J., Tepan, S., Zhang, Y.M., Lindsay, H., Burger, A., Campbell, N.R., Kim, I.S., Hollmann, T.J., Studer, L., Mosimann, C., White, R.M., 2018. Cancer modeling by transgene electroporation in adult Zebrafish (TEAZ). *Dis Model Mech* 11, dmm034561.
- Chaverra-Rodriguez, D., Macias, V.M., Hughes, G.L., Pujhari, S., Suzuki, Y., Peterson, D.R., Kim, D., McKeand, S., Rasgon, J.L., 2018. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing. *Nat Commun* 9, 3008.
- Chen, Q., Takagi, M., Mogi, M., Kikuchi, M., Saito, Y., Nakamura, S., Yokoi, H., Seikai, T., Uji, S., Suzuki, T., 2017. External asymmetry and pectoral fin loss in the Bamboo Sole (*Heteromycteris japonica*): small-sized sole with potential as a pleuronectiformes experimental Model. *Zoolog Sci* 34, 377-385.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757-761.
- Clelland, E., Peng, C., 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Mol Cell Endocrinol* 312, 42-52.
- Goto, R., Saito, T., Matsubara, T., Yamaha, E., 2019. Microinjection of marine fish eggs. *Methods Mol Biol* 1874, 475-487.

- Gratacap, R.L., Wargelius, A., Edvardsen, R.B., Houston, R.D., 2019. Potential of genome editing to improve aquaculture breeding and production. *Trends Genet* 35, 672-684.
- Hashimoto, M., Yamashita, Y., Takemoto, T., 2016. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev Biol* 418, 1-9.
- Higuchi, K., Kazeto, Y., Ozaki, Y., Yamaguchi, T., Shimada, Y., Ina, Y., Soma, S., Sakakura, Y., Goto, R., Matsubara, T., Nishiki, I., Iwasaki, Y., Yasuike, M., Nakamura, Y., Matsuura, A., Masuma, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Masaoka, T., Kobayashi, T., Fujiwara, A., Gen, K., 2019. Targeted mutagenesis of the ryanodine receptor by Platinum TALENs causes slow swimming behaviour in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Sci Rep* 9, 13871.
- Hine, C.M., Seluanov, A., Gorbunova, V., 2012. Rad51 promoter-targeted gene therapy is effective for in vivo visualization and treatment of cancer. *Mol Ther* 20, 347-355.
- Holzbach, T., Vlaskou, D., Neshkova, I., Konerding, M.A., Wörtler, K., Mykhaylyk, O., Gänsbacher, B., Machens, H.G., Plank, C., Giunta, R.E., 2010. Non-viral VEGF(165) gene therapy--magnetofection of acoustically active magnetic lipospheres ('magnetobubbles') increases tissue survival in an oversized skin flap model. *J Cell Mol Med* 14, 587-599.
- Iwaizumi, M., Yokoi, H., Suzuki, T., 2020. Plasmid delivery by electroporation into fish skeletal muscle for recombinant protein secretion and uptake by oocytes. *Fish Physiol Biochem* 46, 1121-1130.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Kim, J., Cho, J.Y., Kim, J.-W., Kim, H.-C., Noh, J.K., Kim, Y.-O., Hwang, H.-K., Kim, W.-J., Yeo, S.-Y., An, C.M., Park, J.Y., Kong, H.J., 2019. CRISPR/Cas9-mediated myostatin disruption enhances muscle mass in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 512, 734336.
- Kishimoto, K., Nakayama, M., Kinoshita, M., 2016. In vivo recombination efficiency of two site-specific recombination systems, VCre/VloxP and SCre/SloxP, in medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ* 58, 516-521.



- Kishimoto, K., Washio, Y., Yoshiura, Y., Toyoda, A., Ueno, T., Fukuyama, H., Kato, K., Kinoshita, M., 2018. Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture* 495, 415-427.
- Kotani, H., Taimatsu, K., Ohga, R., Ota, S., Kawahara, A., 2015. Efficient Multiple genome modifications induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 Protein complex in zebrafish. *PLoS One* 10, e0128319.
- Li, A., Sadasivam, M., Ding, J.L., 2003. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtgR) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. The first three ligand-binding repeats of VtgR interact with the amino-terminal region of Vtg. *J Biol Chem* 278, 2799-2806.
- Li, W., Nicol, F., Szoka, F.C., Jr., 2004. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 967-985.
- Lv, W., Jiang, P., Wang, W., Wang, X., Wang, K., Chang, L., Fang, Y., Chen, J., 2018. Electrotransfer of single-chain LH gene into skeletal muscle induces early ovarian development of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen Comp Endocrinol* 259, 12-19.
- Matsuda, Y., Ito, Y., Hashimoto, H., Yokoi, H., Suzuki, T., 2011. Detection of vitellogenin incorporation into zebrafish oocytes by FITC fluorescence. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 45.
- Minamihata, K., Maeda, Y., Yamaguchi, S., Ishihara, W., Ishiwatari, A., Takamori, S., Yamahira, S., Nagamune, T., 2015. Photosensitizer and polycationic peptide-labeled streptavidin as a nano-carrier for light-controlled protein transduction. *J Biosci Bioeng* 120, 630-636.
- Morita, T., Yoshizaki, G., Kobayashi, M., Watabe, S., Takeuchi, T., 2004. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res* 13, 551-557.
- Murakami, Y., Horibe, T., Kinoshita, M., 2019. Development of an efficient bioreactor system for delivering foreign proteins secreted from liver into eggs with a vitellogenin signal in medaka *Oryzias latipes*. *Fish Sci* 85, 677-685.

Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B.K., Serrano, A.L., 2013. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? FEBS J 280, 4131-4148.

Myllymaki, H., Niskanen, M., Oksanen, K., Ramet, M., 2018. Immunization of adult zebrafish for the preclinical Screening of DNA-based vaccines. J Vis Exp e58453.

Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Koyano, T., Arifin, N., Nakamura, S., Wada, K., Gurumurthy, C.B., 2018. i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. Genome Biol 19, 25.

岡田政人、三木裕明、宮崎香、2013 改定第4版 タンパク質実験ノート 下巻 タンパク質を調べよう (機能解析編) 第4章 タンパク質相互作用の解析 林達也 三木裕明 ④ Blue Native PAGE、羊土社、128-130。

Rungger, D., Muster, L., Georgiev, O., Rungger-Brändle, E., 2017. Oocyte shuttle, a recombinant protein transporting donor DNA into the. Biol Open 6, 290-295.

Sato, Y., Kasai, T., Nakagawa, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Kawakami, K., Takahashi, Y., 2007. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. Dev Biol 305, 616-624.

Sawatari, E., Hashimoto, H., Matsumura, T., Iwata, Y., Yamamoto, N., Yokoyama, Y., Wakamatsu, Y., 2009. Cell growth-promoting activity of fluid from eye sacs of the bubble-eye goldfish (*Carassius auratus*). Zoolog Sci 26, 254-258.

Sokolowska, E., Blachnio-Zabielska, A.U., 2019. A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle. Int J Mol Sci 20.

Takahashi, G., Gurumurthy, C.B., Wada, K., Miura, H., Sato, M., Ohtsuka, M., 2015. GONAD: Genome-editing via oviductal nucleic acids delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. Sci Rep 5, 11406.

Terova, G., Rimoldi, S., Bernardini, G., Saroglia, M., 2013. Inhibition of myostatin gene expression in skeletal muscle of fish by in vivo electrically mediated dsRNA and shRNAi delivery. Mol Biotechnol 54, 673-684.

Tomizawa, M., Shinozaki, F., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Sueishi, M., 2013. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J Methodol* 3, 39-44.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Witthames, P.R., 1990. The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 43, 202-209.

Westerfield, M., 2007. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio ("Brachydanio Rerio")*. University of Oregon.